



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE INGENIRÍA  
QUÍMICA, AMBIENTAL Y DE LOS  
MATERIALES**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO CON  
AGUA CALIENTE EN FASE LÍQUIDA DE LA  
PAJA DE TRIGO PARA SU CONVERSIÓN  
BIOLÓGICA A ETANOL**

**PRESENTADA POR:  
JOSÉ ANTONIO PÉREZ JIMÉNEZ**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. EULOGIO CASTRO GALIANO  
DRA. DÑA. PALOMA MANZANARES SECADES  
DR. D. IGNACIO BALLESTEROS PERDICES**

**JAÉN, 16 DE MAYO DE 2008**

**ISBN 978-84-8439-833-2**

**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES



**TESIS DOCTORAL**

ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE  
EN FASE LÍQUIDA DE LA PAJA DE TRIGO PARA SU  
CONVERSIÓN BIOLÓGICA A ETANOL

José Antonio Pérez Jiménez  
Jaén, 2008

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS.....	i
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 LA BIOMASA COMO FUENTE DE ENERGÍA RENOVABLE.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Contexto general.....	5
1.1.2 Combustibles a partir de biomasa: biocombustibles.....	7
<b>1.2 BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 La paja de trigo como materia prima para la producción de bioetanol.....	10
<b>1.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. COMPONENTES PRINCIPALES. ....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Polisacáridos .....	12
1.3.1.1 Celulosa.....	12
1.3.1.2 Hemicelulosas .....	14
1.3.1.3 Pectinas .....	18
1.3.2 Lignina.....	19
1.3.3 Otros Componentes.....	22
1.3.4 Disposición de los componentes principales en la pared celular vegetal.....	25
1.3.4.1 Lámina Media .....	26
1.3.4.2 Pared Primaria.....	26
1.3.4.3 Pared secundaria.....	27
1.3.4.3.1 Enlaces Hemicelulosa-Lignina en la pared secundaria de la paja de trigo.....	29
<b>1.4 PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA         LIGNOCELULÓSICA.....</b>	<b>33</b>
1.4.1 Procesos basados en hidrólisis ácida.....	34
1.4.2 Procesos basados en hidrólisis enzimática.....	37
1.4.2.1 Diferentes configuraciones de proceso para la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica vía enzimática .....	42
<b>1.5 PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....</b>	<b>46</b>

<b>1.5.1 Pretratamientos físicos</b>	48
1.5.1.1 Trituración mecánica	48
1.5.1.2 Molienda comprimida	48
1.5.1.3 Radiación de alta energía	49
<b>1.5.2 Pretratamientos físico – químicos</b>	49
1.5.2.1 Explosión por vapor	49
1.5.2.2 Pretratamiento con agua caliente en fase líquida (PACL)	50
1.5.2.2.1 <i>Modo de acción</i>	50
1.5.2.2.2 <i>Configuraciones de proceso</i>	51
1.5.2.3 Pretratamientos con amoníaco	53
1.5.2.4 Oxidación húmeda	54
1.5.2.5 Pretratamiento con microondas	55
1.5.2.6 Pirólisis	55
<b>1.5.3 Pretratamientos químicos</b>	55
1.5.3.1 Pretratamientos ácidos	56
1.5.3.2 Pretratamientos básicos	57
1.5.3.3 Ozonólisis	59
1.5.3.4 Tratamiento con organosolventes	59
1.5.3.5 Deslignificación oxidativa	59
<b>1.5.4 Pretratamientos biológicos</b>	60
<b>1.5.5 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento</b>	60
1.5.5.1 Tipos y procedencia	60
<b>1.5.6 Principales reacciones químicas implicadas en la desestructuración de la biomasa lignocelulósica como consecuencia de la acción de agentes hidrolíticos en el pretratamiento</b>	63
1.5.6.1 Despolimerización de la celulosa	64
1.5.6.2 Desestructuración de las hemicelulosas	68
1.5.6.2.1 <i>Formación del Ácido Acético</i>	68
1.5.6.2.2 <i>Reacciones de despolimerización en medio ácido</i>	69

1.5.6.3 Desestructuración del complejo hemicelulosa-lignina.....	73
1.5.6.3.1 Ruptura del enlace tipo éster.....	73
<b>1.6 DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS .....</b>	<b>79</b>
<b>1.6.1 Definición.....</b>	<b>79</b>
<b>1.6.2 Método tradicional vs. Diseño Estadístico de Experimentos .....</b>	<b>80</b>
<b>1.6.3 Metodología del DEE.....</b>	<b>81</b>
<b>2. OBJETO e INTERÉS del TEMA .....</b>	<b>85</b>
<b>3. MATERIALES y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
<b>3.1 MATERIA PRIMA.....</b>	<b>91</b>
<b>3.2 PRETRATAMIENTO MEDIANTE AGUA CALIENTE EN FASE</b>	
<b>LÍQUIDA (PACL).....</b>	<b>91</b>
<b>3.2.1 Condiciones de pretratamiento en las distintas fases de la</b>	
<b>investigación.....</b>	<b>93</b>
3.2.1.1 Estudio del efecto de las variables de proceso en el pretratamiento	
<i>(Diseño 1) .....</i>	<i>93</i>
3.2.1.2 Optimización de pretratamiento en una etapa ( <i>Diseño 2</i> ).....	94
3.2.1.3 Optimización del pretratamiento en dos etapas.....	95
3.2.1.3.1 Primera etapa del pretratamiento en dos etapas .....	96
3.2.1.3.2 Segunda etapa del pretratamiento en dos etapas .....	97
<b>3.3 ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....</b>	<b>98</b>
<b>3.4 ENSAYOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN</b>	
<b>SIMULTÁNEAS (SFS).....</b>	<b>99</b>
<b>3.4.1 Microorganismo fermentador. Preparación del inóculo.....</b>	<b>99</b>
<b>3.4.2 Pruebas de sacarificación y fermentación simultáneas .....</b>	<b>99</b>
3.4.2.1 SFS con residuo pretratado a 188 °C y 40 min.....	100
3.4.2.1.1 Estudios de fermentabilidad de la fracción líquida.....	100
3.4.2.1.2 Ensayos de SFS .....	100
3.4.2.2 SFS en los RSI del pretratamiento en dos etapas (219 °C y 6 min) y	
una etapa (214 °C y 2,7 min) .....	101

<b>3.5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>3.5.1 Caracterización de la materia prima y del material pretratado .....</b>	<b>101</b>
<b>3.5.2 Caracterización de la fracción líquida obtenida tras el             pretratamiento .....</b>	<b>103</b>
3.5.2.1 Azúcares.....	103
3.5.2.2 Productos de Degradación.....	103
<b>3.5.3 Determinación de Etanol.....</b>	<b>104</b>
<b>3.6 DEFINICIÓN DE VARIABLES .....</b>	<b>104</b>
<b>3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>108</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....</b>	<b>111</b>
<b>4.2 PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE TRIGO MEDIANTE AGUA             CALIENTE EN FASE LÍQUIDA .....</b>	<b>112</b>
<b>4.2.1 Efecto de las variables de proceso en el pretratamiento .....</b>	<b>115</b>
4.2.1.1 Determinación del intervalo de trabajo de tiempo y temperatura .....	115
4.2.1.1.1 Recuperación de sólidos.....	115
4.2.1.1.2 Recuperación de azúcares en RSI .....	116
4.2.1.1.3 Recuperación de azúcares en la fracción líquida. ....	117
4.2.1.1.4 Susceptibilidad al ataque enzimático del RSI .....	119
4.2.1.1.5 Rendimiento global de azúcares.....	121
4.2.1.2 Estudio del efecto de las variables de proceso en el pretratamiento por ACL de la paja de trigo .....	123
4.2.1.2.1 Ajuste del modelo .....	126
4.2.1.2.2 Composición del RSI .....	127
4.2.1.2.3 Análisis de la fracción líquida.....	132
4.2.1.2.4 Digestibilidad enzimática del RSI .....	136
4.2.1.3 Consideraciones a tener en cuenta para los posteriores estudios de optimización. ....	140
<b>4.2.2 Pretratamiento en una etapa .....</b>	<b>142</b>

4.2.2.1 Optimización del pretratamiento para maximizar la recuperación de azúcares en la fracción líquida y la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática.....	142
4.2.2.2 Optimización del pretratamiento para maximizar la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática.....	151
4.2.2.3 Verificación de las condiciones óptimas de pretratamiento .....	153
4.2.2.4 Rendimiento global de azúcares.....	156
<b>4.2.3 Pretratamiento en dos etapas .....</b>	<b>158</b>
4.2.3.1 Primera etapa de pretratamiento. Optimización de la RAH en la fracción líquida. ....	159
4.2.3.1.1 Verificación de la condición óptima.....	165
4.2.3.2 Segunda Etapa de pretratamiento.....	166
4.2.3.2.2 Verificación de la condición óptima.....	175
<b>4.2.4 Rendimiento global de azúcares en las configuraciones de pretratamiento óptimas estudiadas.....</b>	<b>176</b>
<b>4.3 ENSAYOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA.....</b>	<b>179</b>
4.3.1 Ensayos de SFS sobre el residuo pretratado completo procedente del pretratamiento en una etapa. ....	179
4.3.2 Ensayos de SFS sobre los RSI procedentes del pretratamiento en una y dos etapas.....	184
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>193</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>197</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>213</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>221</b>





---

# ABREVIATURAS y SÍMBOLOS



## **ABREVIATURAS**

- ACL: agua caliente en fase líquida
- ACV: Análisis del Ciclo de Vida
- AD: ácido diferúlico
- AF: ácido ferúlico
- AFEX: del Inglés “ammonia fibre/freeze explosion”
- AH: azúcares hemicelulósicos
- ApC: ácido p-cumárico
- ARP: del inglés “ammonia recycle percolation”
- BPC: bioprocesos consolidados
- C.S.: Carga de Sustrato
- CBH: celobiohidrolasas
- CBM: del Inglés “Carbohydrate Binding Domain”
- CDH: celulosa deshidrogenada
- CECT: colección española de cultivos tipo
- CMC: carboximetilcelulasa
- DEE: Diseño estadístico de experimentos
- DER-CIEMAT: Departamento de Energías Renovables-Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DOE: del Inglés “Department of Energy”
- DP: pretratamiento en dos etapas
- EDA: Etilendiamina
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EG: endoglucanasa
- ETBE: etil ter-butil éter
- EX: exoglucanasa
- FFV: del Inglés “Flexible Fuel Vehicle”
- FL: Fracción líquida
- HA: hidrólisis ácida
- HE: hidrólisis enzimática
- HFS: hidrólisis y fermentación por separado
- HMF: hidroximetilfurfural
- HPLC: del Inglés “high performance liquid chromatography”
- IDAE: Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía
- MLB: medio líquido basal

- MMA: Ministerio de Medio Ambiente
- MP: materia prima
- MTBE: metil ter-butil éter
- Mtep: millones de toneladas equivalentes de petróleo
- NREL: del Inglés “National Renewable Energy Laboratory”
- PACL: pretratamiento con agua caliente en fase líquida
- PER: Plan de Energías Renovables
- RAH: recuperación de azúcares hemicelulósicos
- RGA: rendimiento global de azúcares
- RHE. rendimiento de hidrólisis enzimática
- RP: Residuo pretratado
- RS: recuperación de sólidos
- RSI: residuo sólido insoluble
- SAA: del Inglés “soaking in aqueous ammonia”
- SCFS: sacarificación y co-fermentación simultáneas
- SFS: sacarificación y fermentación simultáneas
- UE: Unión Europea
- UV: ultravioleta

## **SÍMBOLOS**

- min: minuto
- p/p: relación peso/peso
- p/v: relación peso/volumen
- UI: unidades internacionales
- UPF: unidades de papel de filtro
- v/v: relación volumen/volumen

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 LA BIOMASA COMO FUENTE DE ENERGÍA RENOVABLE

### 1.1.1 Contexto general

El papel que las energías renovables pueden jugar en el reforzamiento de la seguridad de abastecimiento energético y en la disminución de la emisión de gases de efecto invernadero ha sido objeto de un intenso debate durante los últimos años en la Unión Europea (Comisión Europea, 2001), y en general, en el mundo desarrollado. La demanda energética europea está dominada por los sectores doméstico, industrial y del transporte, siendo este último el responsable de aproximadamente el 25% del aporte de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Actualmente, y teniendo como referencia el primer periodo de industrialización hacia 1750, se ha producido un incremento en la atmósfera en este gas, de aproximadamente un 30 % (Rentizelas y col., 2006). La principal razón de este aumento desproporcionado ha sido el progresivo incremento de la utilización como recurso energético de combustibles de origen fósil, tales como petróleo, carbón y gas (Cardona y Sánchez, 2007). La toma de conciencia del efecto negativo que el elevado consumo de energía fósil del mundo desarrollado tiene en el medio ambiente promovió ya hace unos años que los países implicados empezaran a trabajar en la búsqueda de soluciones al problema. El comienzo de dichos trabajos quedó enmarcado en la “Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático” que se celebró el 9 de Mayo de 1992 en Nueva York con los líderes políticos representantes de los países más industrializados del mundo. En dicha convención se estableció la siguiente definición para el fenómeno de cambio climático:

“Por **cambio climático** se entiende un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo comparables”

Artículo 1, párrafo 2

El objetivo principal de este encuentro fue lograr la estabilización de las concentraciones de *gases de efecto invernadero* en la atmósfera, a un nivel que impida interferencias antropógenas (atribuidas al hombre) peligrosas en el sistema climático. Todo ello en un plazo suficiente para permitir que los ecosistemas se adapten de manera natural al cambio climático, asegurando que la producción de alimentos no se vea amenazada y permitiendo que el desarrollo económico prosiga de manera sostenible.

Para llevar a cabo este objetivo, en 1997, los gobiernos acordaron incorporar una adición a la Convención Marco, conocida con el nombre de “Protocolo de Kyoto”, que cuenta

con medidas enérgicas, y jurídicamente vinculantes, para la reducción de las emisiones de seis gases responsables del calentamiento global, entre ellos el CO<sub>2</sub>. Según el compromiso de Kyoto, la UE se ha comprometido a disminuir sus emisiones de gases de efecto invernadero en un 8% hasta el período 2008-2012. A lo largo de estos años, se han celebrado una serie de reuniones con el objetivo de elaborar las líneas maestras para un nuevo acuerdo, que establecería los compromisos de reducciones de gases de efecto invernadero tras el año 2012, en que acaban los compromisos del Protocolo de Kyoto. La última de estas reuniones, celebrada en Bali en diciembre de 2007, concluyó con un acuerdo final que incluye, entre otras medidas, un mandato para negociar una segunda fase más firme del Protocolo de Kyoto para el año 2009. En dicha reunión, la UE desempeñó un papel de liderazgo en el tema, proponiendo una horquilla de reducciones del 25 al 40% de las emisiones para el año 2020.

La combinación del efecto negativo que las emisiones de gases de efecto invernadero producen en la atmósfera, junto con la fuerte dependencia energética que la Unión Europea sufre de los países exportadores de petróleo (más del 50 %, con una previsión del 70% en 20 ó 30 años), ha dado lugar a una serie de esfuerzos para optimizar el uso de la energía. Los primeros pasos para la introducción de las energías renovables en las políticas energéticas europeas llevaron a la publicación en el año 1997 del Libro Blanco de la Comisión Europea, en el que se fijó un objetivo del 12% de contribución de las energías renovables para el 2010 (Comisión Europea, 1997). Desde entonces se ha seguido trabajando en esta dirección, habiéndose publicado diversos documentos respecto a la contribución de las fuentes de energías renovables en los diversos sectores de consumo.

Paralelamente, en España, y siguiendo las directrices europeas, el gobierno aprobó en diciembre de 1999 el Plan de Fomento de las Energías Renovables 2000-2010, que posteriormente fue revisado y sustituido en 2005 por el Plan de Energías Renovables (PER) 2005-2010, en vigor actualmente. Este Plan recoge el compromiso de cubrir con fuentes renovables al menos el 12 % del consumo energético en el año 2010. En cuanto a la contribución de la biomasa, el Plan prevé que este recurso pueda aportar un total de 12.252 ktep para el año 2010, en sus vertientes de aplicación en electricidad, energía térmica y combustibles para el sector transporte. Esta contribución representa un 60,62% del total de la previsión de contribución de las distintas energías renovables, en términos de energía primaria (PER, 2005).

Todos los análisis realizados hasta el momento coinciden en identificar a la biomasa como un recurso renovable de enorme potencial debido a su carácter extendido y polivalente, que le permite ser utilizado, a diferencia que otras energías renovables, en la mayoría de los sectores de elevado consumo energético. Una de sus más importantes ventajas es que es la única energía renovable que, a corto plazo, puede aportar soluciones en el sector transporte mediante la obtención de combustibles alternativos a partir de la misma.



### 1.1.2 Combustibles a partir de biomasa: biocombustibles

Según la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588, se define *biomasa* como “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización”. Las ventajas del uso de la biomasa como fuente de energía renovable son múltiples, y una de ellas es que la utilización de los productos derivados de la misma origina menos emisiones contaminantes que los combustibles fósiles tradicionales. Otra de las características más significativas de la biomasa radica en la descentralización que supone su producción y consumo; la energía procedente de la biomasa sería gestionada por la misma comunidad que la va a consumir, garantizando por tanto cierta independencia energética.

Dentro de un contexto centrado en la producción de combustibles alternativos, y atendiendo a su composición, se podría establecer que existen cuatro tipos de biomasa; la *biomasa azucarada*, como la remolacha y la caña de azúcar, la *biomasa amilácea*, granos de cereal, la *biomasa oleaginosa*: semillas de jatrofa, soja, colza, girasol...etc., y la *biomasa lignocelulósica*. Dentro de este último grupo se consideran las maderas (olivo, eucalipto, pino, chopo, álamo...etc.), los cultivos energéticos, los residuos agrícolas (pajas de cereales, residuos del maíz,...etc.), los residuos de la industria forestal y de las prácticas silvícolas, los residuos procedentes de la industria del papel y de algunas industrias alimentarias, así como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

El término *biocombustible* engloba genéricamente a todos aquellos combustibles generados a partir de biomasa. Dependiendo de su naturaleza cabe distinguir entre biocombustibles sólidos, líquidos o gaseosos, los cuales tienen diversas aplicaciones energéticas. Así los *biocombustibles sólidos* son aquellos utilizados en procesos de transformación termoquímica como combustión o gasificación para producir calor y electricidad. Ejemplos de estos biocombustibles serían los densificados, pellets o briquetas de biomasa seca, generalmente lignocelulósicas. Los *biocombustibles líquidos* son aquellos combustibles derivados de biomasa, de aplicación en motores térmicos de combustión interna. Los *biocombustibles líquidos* más desarrollados hasta el momento son el biodiesel y el bioetanol, si bien también existen otros productos obtenidos a partir de biomasa, menos desarrollados, como los aceites vegetales, el biometiléter, el biometanol y su derivado el biometil-terciario-butil-éter, que también quedan englobados en el término de biocombustibles líquidos. Finalmente, los biocombustibles gaseosos comprenden el biogás y el biohidrógeno, aunque este último está todavía en fase de investigación en cuanto a su producción y aprovechamiento. El *biogás* se obtiene a partir de la fracción biodegradable de los residuos sólidos urbanos y puede ser utilizado en turbinas de gas para producir electricidad o en motores de combustión interna.

Estos biocombustibles líquidos y gaseosos reciben genéricamente el nombre de *biocarburantes* por su aplicación principal en motores.

La utilización de biocombustibles líquidos como el bioetanol en el sector transporte ha sido reconocida por los responsables de las políticas energéticas europeas como una de las alternativas más prometedoras a corto plazo frente a la utilización de combustibles de origen fósil. La Comunidad Europea han estado trabajando en los últimos años en el establecimiento de una serie de acciones prioritarias para fomentar la producción e introducción en el mercado de estos nuevos combustibles. Se ha fijado un objetivo común a todos los países miembros, a cumplirse en el 2010, de que el 5,75 % del equivalente energético de los combustibles usados en el transporte deberán ser biocombustibles (Directiva 2003/30/CE, 2003). España ha asumido este objetivo, y según se recoge en el PER (2005), un 5,83 % de los combustibles consumidos en 2010 en nuestro país deberán ser obtenidos a partir de biomasa.

## 1.2. BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE

La historia del uso del etanol como combustible para motores se remonta al siglo XIX. Ya en **1826**, el norteamericano Samuel Morey construye un motor de combustión interna para ser accionado con una mezcla de etanol y trementina. Cincuenta años más tarde, en **1876**, el ingeniero alemán, Nicolás Otto, desarrolla y perfecciona el primer motor de combustión interna que funcionaría a base de etanol, el cual, 20 años después, en **1896**, será implementado por Henry Ford en el primer automóvil de cuatro tiempos, (cuadricycle) movido por etanol puro, y 10 años más tarde, en el famoso Modelo T, un vehículo de combustible flexible, apto para funcionar tanto con etanol como con gasolina, o una combinación de los dos. A partir de este momento, la rápida introducción de la gasolina como combustible en vehículos de automoción relegó a un segundo plano el uso del etanol, hasta que las últimas crisis del petróleo y la creciente concienciación de los efectos medioambientales que tiene el elevado consumo de combustibles fósiles, han motivado en los últimos años un nuevo impulso para su desarrollo.

El etanol obtenido a partir de biomasa, denominado bioetanol, se puede emplear como combustible en sustitución parcial o total de la gasolina. El proceso de obtención de bioetanol tiene en su última etapa una fermentación alcohólica, tras la que se obtiene un mosto con un grado alcohólico variable, dependiendo de la materia prima empleada. Este mosto se puede concentrar por destilación hasta la obtención del “alcohol hidratado” (4-5% agua) o deshidratar hasta un alcohol absoluto (99,4 % mínimo de pureza).

En la actualidad, el etanol puede utilizarse en los motores de diversas formas. Por ejemplo, puede utilizarse como etanol puro en mezclas con gasolina en bajas proporciones, 5-10-15 % (E5, E10 y E15), para lo que no se necesitan modificaciones en los motores actuales. También puede emplearse en proporciones más elevadas, como el denominado E85 (15 % de

gasolina y 85 % de etanol), que se utiliza en vehículos especialmente diseñados, denominados FFV (Flexible Fuel Vehicle). Otra forma indirecta de utilización de etanol es mediante la incorporación de un aditivo derivado del etanol, el ETBE (etil ter-butil éter), producto principal de la reacción en la que interviene una molécula de etanol y otra de isobuteno (subproducto en las refinerías de petróleo). Actualmente todas las gasolinas en España utilizan ETBE como aditivo oxigenado.

La producción actual de bioetanol está basada en la utilización de materias primas azucaradas (caña de azúcar y remolacha) y amiláceas (trigo, cebada y maíz). Los mayores productores de etanol son Brasil, que lo obtiene a partir de caña de azúcar y EEUU, donde se produce a partir de maíz. En estos países las producciones en 2005 ascendieron a 16,8 [Brazil Biofuel Market Outlook (2007-2010)] y 15,2 GJ (Renewable Fuels Association, EEUU, 2006), respectivamente. En Europa el bioetanol se produce fundamentalmente a partir de grano de cereal, siendo España el país líder en producción (317.000 t en el año 2006), seguido muy de cerca de Alemania y Francia (315.760 y 234.306 t, respectivamente) (EurObserv'ER, 2007).

El principal problema derivado de la producción de bioetanol a partir de este tipo de biomásas radica en el alto coste de la materia prima, ya que las biomásas azucarada y amilácea utilizadas son materias ligadas íntegramente al mercado alimentario, lo que repercute substancialmente en el precio final del proceso (Hamelinck y *col.*, 2005; Lin y Tanaka, 2007). El bioetanol producido actualmente a nivel industrial a partir de los materiales antes mencionados forma parte de los denominados “*biocarburantes de primera generación*”, cuya tecnología de producción se encuentra ya disponible en el mercado. Si bien el uso de productos agrícolas tradicionales para la producción de biocarburantes está provocando en los últimos tiempos algún debate acerca de su posible efecto desestabilizador en los mercados alimentarios de este tipo de materias primas, existen pocas dudas acerca del beneficio medioambiental de la utilización de estos combustibles alternativos. Un reciente estudio de Análisis de Ciclo de Vida (ACV) de los biocombustibles en España (MMA, 2005), ha concluido que la producción, distribución y uso de los mismos permite reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Concretamente para el caso del bioetanol producido a partir de grano de trigo y cebada, el uso de vehículos E85 funcionando con este combustible permite reducir en un 70% las emisiones de gases de efecto invernadero por cada kilómetro recorrido, en comparación con la gasolina. Una mezcla de gasolina con sólo un 5% de bioetanol (E5) permite ya una reducción de emisiones del 3%. El citado estudio también realiza un balance sobre la eficiencia energética derivada del uso de los biocarburantes. Para el caso concreto del bioetanol, el uso del E85 ahorra un 17% de energía primaria y un 36 % de energía fósil por cada kilómetro recorrido respecto de la gasolina.

La introducción del bioetanol en el mercado de los combustibles no solo se ve respaldada por la baja adición neta de CO<sub>2</sub> que éste emite a la atmósfera, sino también por una serie de propiedades favorables respecto a la gasolina. Por ejemplo, el bioetanol presenta un

mayor índice de octano (96-116) que la gasolina (85-96), lo cual reduce la necesidad de añadir componentes optimizadores de éste parámetro, de naturaleza tóxica (Wyman, 1996). A un mayor índice de octano, un mayor ratio de compresión, lo que se traduce en una mayor eficiencia del motor y más potencia. El etanol también presenta una mayor proporción oxígeno/carbono que la gasolina, lo que da lugar a una combustión más completa, reduciendo las emisiones de hidrocarburos y CO. Por otra parte, el calor de vaporización del etanol es más elevado que en la gasolina, lo que dificulta el arranque en frío del motor.

Como opción de futuro frente a la utilización de biocarburantes de primera generación, el bioetanol se puede producir a partir de biomasa lignocelulósica, que se encuentra ampliamente distribuida, no interfiere en el mercado agroalimentario y, ya que inicialmente su coste es menor, su uso contribuye a disminuir el coste final del mismo. El bioetanol y otros biocarburantes producidos a partir de biomasa lignocelulósica constituyen el grupo de los denominados “*biocarburantes de segunda generación*”, cuyas tecnologías de producción todavía están en fase de investigación y desarrollo, no encontrándose disponibles en el mercado. La Comisión Europea ha señalado que la consecución del objetivo del 10% de biocarburantes en 2020 no va a crear tensiones significativas en los mercados agrícolas y alimentarios, siendo éste un objetivo alcanzable de manera sostenible y sin provocar desequilibrios económicos a nivel europeo y mundial (European Commision, 2007), ya que en dicha previsión se ha considerado que un 30% de los biocarburantes que se consumirán en el mercado europeo en 2020 estarán producidos a partir de *biomasa lignocelulósica*.

El potencial de la biomasa lignocelulósica para la producción de etanol de 2ª generación es equivalente a 16 veces la producción mundial actual (1ª generación), además de la capacidad de generar cerca del 4% de la producción eléctrica mundial mediante el uso del residuo rico en lignina que se obtiene como subproducto del proceso de obtención de etanol (Kim y Dale, 2004). Por otra parte, el acceso que las diferentes regiones del mundo tienen a este tipo de biomasa, la hacen atractiva para la descentralización económica del suministro de combustible, así como para la creación de empleo en el ámbito rural (Wyman, 2007).

### 1.2.1 La paja de trigo como materia prima para la producción de bioetanol

La utilización de materias primas baratas, de naturaleza lignocelulósica y residual, como por ejemplo **la paja de trigo**, es actualmente una de las opciones más interesantes para abaratar el coste del proceso de producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables, y hacerlo así competitivo con aquellos derivados de fuentes fósiles.

El trigo es uno de los tres cereales más producidos globalmente, junto al maíz y el arroz (FAOSTAT, 2007) y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la antigüedad. Hoy día, los mayores productores de trigo en el mundo son Asia (51 %) y

Europa (37 %). La paja es el tallo seco de la planta después de la separación del grano para su utilización en la obtención de harina, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios. Actualmente, la paja de trigo constituye un residuo agrícola, que normalmente se deja en el campo, o es arado para mantener la salud del suelo y prevenir la erosión (Edmundo y *col.*, 2006). En el peor de los casos, el residuo se quema en el campo, con el consiguiente efecto negativo sobre el medioambiente que ello conlleva.

Dependiendo del tipo de trigo y de la zona donde se cultive, podemos encontrar que, aproximadamente, por cada kg de trigo producido se genera 1,1 kg. de paja (Bamaga y *col.*, 2003). Teniendo en cuenta que la producción mundial de trigo es de alrededor de 620 millones de toneladas (FAOSTAT, 2007), la cantidad de paja generada durante el último año superaría los 680 millones de toneladas, constituyendo un residuo agrícola muy extenso y ampliamente distribuido. Considerando la cantidad de paja de trigo destinada al mantenimiento del suelo, a la producción animal y al uso industrial, se ha estimado que aproximadamente un 60 % de la producción mundial (370 millones de toneladas) podría llegar a utilizarse con fines energéticos (Kim y Dale, 2004).

### 1.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. COMPONENTES PRINCIPALES.

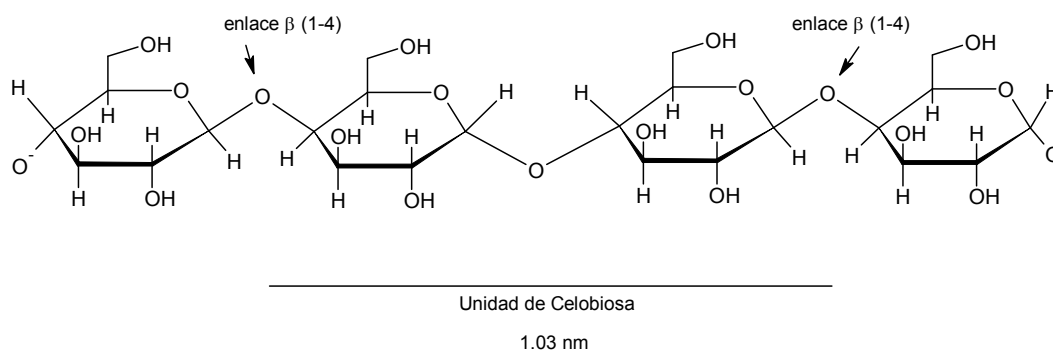
La biomasa lignocelulósica está constituida por tres componentes fundamentales; los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, y la lignina, junto con otras sustancias menos abundantes, que no forman parte de la pared celular, tales como extractivos, proteínas y cenizas.

#### 1.3.1 Polisacáridos

El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular, celulosa y hemicelulosa, que representan entre el 60-80% del peso de la biomasa lignocelulósica.

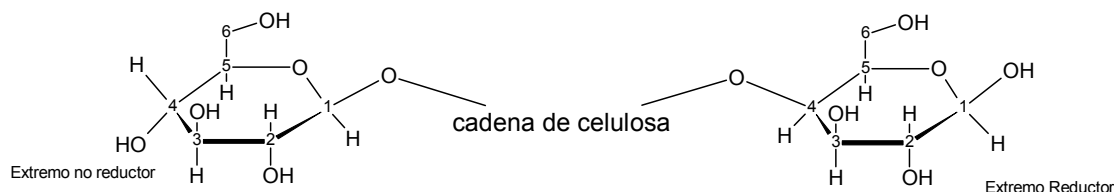
##### 1.3.1.1 Celulosa

La celulosa es la base estructural de las células vegetales y por lo tanto, la más importante sustancia natural producida por los organismos vivos. En la biosfera, existen  $27 \times 10^{10}$  t de carbono, un 99% del cual se encuentra en las plantas (Brett y Waldron, 1996b). Se puede asumir que alrededor del 40 % de este carbono se encuentra en la celulosa, lo cual significa que la cantidad total de esta sustancia estaría alrededor de  $26,5 \times 10^{10}$  t. Estos datos confirman la abundancia de este componente como uno de los mayores recursos naturales en el mundo.



**Figura 1. Parte central de una cadena de celulosa**

Desde el punto de vista estructural, la celulosa es un polímero homogéneo lineal, de elevado peso molecular, constituido por largas cadenas de D-glucosa en forma piranosa unidas por enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico, siendo la celobiosia, con una longitud de 1,3 nm, la unidad que se repite (Figura 1). Aunque existen grupos OH a ambos lados de la cadena de celulosa, éstos presentan diferentes propiedades. El grupo OH del carbono 1 (Figura 2) es un grupo aldehído derivado de una conformación en anillo formado por un enlace intramolecular hemiacetal. Por esta razón, dicho grupo presenta propiedades reductoras, mientras que el grupo OH del carbono 4 es un grupo hidroxil-alcohólico y por lo tanto no reductor (Fengel y Wegener, 1989).



**Figura 2. Extremo reductor y no reductor de una cadena de celulosa**

Los grupos hidroxilo (grupos funcionales de la cadena de celulosa) son capaces de interactuar entre sí o con átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre, originando puentes de hidrógeno. Estos puentes de hidrógeno también se forman entre los grupos hidroxilo de la celulosa y las moléculas de agua, haciendo la superficie de la celulosa altamente hidrofílica. Los puentes de hidrógeno considerados individualmente son uniones débiles, pero el elevado número existente en estas organizaciones estructurales a nivel intramolecular (2 por anhidroglucopiranosas) e intermolecular (2-3 por anhidroglucopiranosas), confieren a la celulosa su rigidez característica.

En cuanto a las propiedades físicas de la celulosa, ésta se encuentra en forma fibrosa, posee una alta resistencia mecánica y es muy insoluble en agua, tanto fría como caliente. Es también insoluble en disolventes orgánicos tales como etanol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono y muy poco soluble en disoluciones diluidas de ácidos y álcalis. Por otra parte, es muy soluble en ácido sulfúrico al 72% y en ácido clorhídrico al 44%. Su degradación, aunque importante, es menos notoria en ácido fosfórico al 85%.

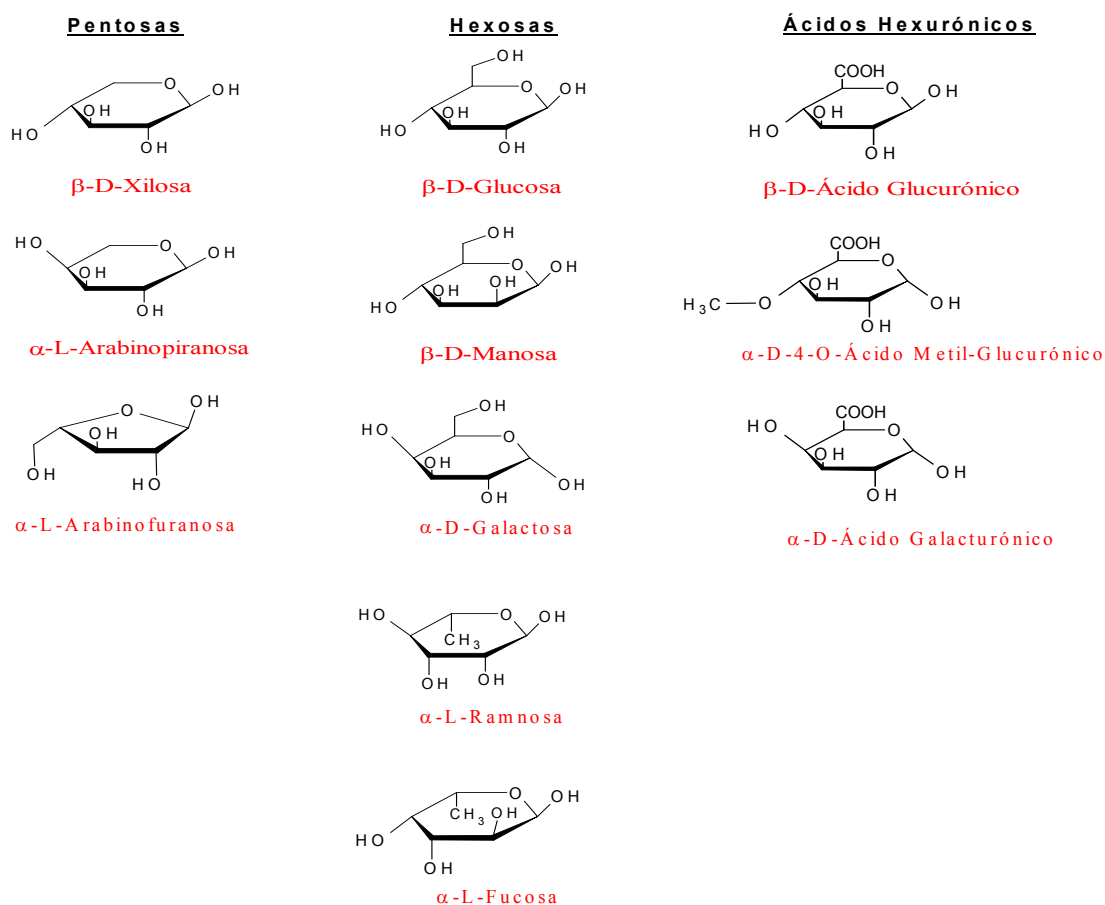
Sobre la forma en que se ordenan las moléculas de celulosa se han postulado diferentes modelos que coinciden en diferenciar entre una zona cristalina de gran ordenación y una zona amorfa (Evers y *col.*, 1999). Los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares son la principal causa de las diferentes conformaciones de la red cristalina de la celulosa (Liu y *col.*, 2005). La celulosa nativa se encuentra en forma de celulosa I, en la que coexisten dos fases (Sun y *col.*, 2005), la celulosa  $I_\alpha$  (cristal triclinico), meta-estable, y la celulosa  $I_\beta$  (cristal monoclinico). Ambas fases se encuentran en diferentes proporciones en función del origen. Concretamente en el caso de los materiales herbáceos, la más abundante es la celulosa  $I_\beta$ . Las diferencias entre ambas se deben principalmente al desplazamiento relativo de las moléculas en dirección de la cadena. Junto a las distintas formas cristalinas, la celulosa también dispone de regiones menos ordenadas denominadas amorfas o paracristalinas. Además de estas conformaciones, se han descrito otros cristales polimórficos designados como II,  $III_1$  y  $III_2$ ,  $IV_1$  y  $IV_2$ , y X, que se obtienen a partir de la celulosa I, tras someterla a diferentes tratamientos.

Se han realizado varios estudios sobre la estructura y morfología de este componente en la paja de trigo (Liu y *col.*, 2005; Yu y *col.*, 2005). La celulosa fue identificada como celulosa I

alomórfica con un bajo grado de cristalinidad, no encontrándose diferencias significativas en el grado de cristalinidad en diferentes partes de la paja de trigo. Además no se encontraron indicios de la estructura metaestable celulosa  $I_\alpha$  cristalina, solamente de la estructura polimórfica cristalina  $I_\beta$ .

### 1.3.1.2 Hemicelulosas

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos de alta masa molar que se encuentran constituidos por diferentes unidades de monosacáridos; pentosas, hexosas y ácidos urónicos (Figura 3), enlazados entre sí por enlaces glicosídicos, dando lugar a estructuras ramificadas y en general amorfas. Su papel principal es proporcionar la unión entre la lignina y la celulosa (Sun y *col.*, 1998).



**Figura 3. Unidades constituyentes de las hemicelulosas**

Las hemicelulosas se diferencian de la celulosa en la composición del monómero constituyente, en la longitud de las cadenas moleculares y en la existencia de ramificaciones mediante enlaces covalentes. Generalmente están constituidas por una cadena principal de un único azúcar, homopolímero, ej. xilano, o de dos o más azúcares, heteropolímero, ej.



glucomanano. Estas cadenas de azúcares se pueden presentar sin ramificaciones o con ramificaciones muy cortas, generalmente de un único azúcar. Una ramificación común en las hemicelulosas de muchas biomásas lignocelulósicas, es el grupo acetilo, el cual lo podemos encontrar esterificado a lo largo de la cadena principal que conforma el esqueleto hemicelulósico.

En función de las características estructurales de la cadena principal, se pueden distinguir tres grupos de hemicelulosas; *los xilanos*, *los mananos* y *los glucanos* (Carpita y Gibeaut, 1993; Brett y Waldron, 1996b).

Los **xilanos** constituyen la fracción hemicelulósica más abundante en la pared celular de las plantas. Están constituidos por un esqueleto básico de residuos de xilopiranosido unidos entre sí mediante enlaces  $\beta(1,4)$ . Los grupos hidroxilo de la xilosa pueden estar sustituidos por grupos 4-O-metil-glucurónico, glucurónico y  $\alpha$ -arabinofuranósido, los que a su vez pueden estar esterificados por los ácidos ferúlico o cumárico. En función de estas sustituciones, los xilanos se encuentran en forma de:

- Xilanos, esqueleto sin ramificaciones. Presentes en la hierba de esparto y tallos de la planta del tabaco.
- Glucuronoxilanos, en los que los grupos hidroxilo pueden estar sustituidos por grupos acetilo (siete de cada diez unidades de xilosa están sustituidas por grupos acetilo), unidos mediante enlaces éster en las posiciones 2 y 3 del anillo de la xilosa, y grupos de ácido 4-O- $\alpha$ -glucurónico, unidos mediante enlaces  $\alpha(1,2)$ , que pueden estar metilados (un residuo de metil-glucurónico por cada diez unidades de xilosa). Este tipo de xilanos es característico de las hemicelulosas de maderas duras, gramíneas y legumbres.
- Arabinoglucuronoxilanos, en los que el esqueleto básico de xilano está sustituido (una por cada diez unidades de xilosa) por grupos de ácido 4-O- $\alpha$ -metilglucurónico mediante enlaces  $\alpha(1,2)$ . También encontramos restos de arabinosa, en una media de 1,3 residuos por cada diez unidades de xilosa, unidas por enlace  $\alpha(1,2)$  ó  $\alpha(1,3)$ . Los arabinoglucuronoxilanos son característicos de las hemicelulosas de maderas blandas.
- Arabinoxilanos, formados por un esqueleto de unidades de xilopiranosidos unidos por enlaces  $\beta(1,4)$ , sustituidos con residuos de arabinosa en las posiciones O-2 y/o O-3. Pueden estar presentes también cadenas laterales, unidas por enlace  $\alpha(1,2)$ , de ácido 4-O-metilglucurónico,  $\beta$ -D-glucopiranososa y  $\beta$ -D-manopiranososa. Los residuos arabinofuranosil están esterificados en los C-3 con ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Cyran y *col.*, 2003). Este tipo de xilanos los encontramos en las hemicelulosas de gramíneas.

Otro tipo de hemicelulosas lo constituyen los **mananos**, que a su vez se clasifican en:

- Glucomananos, que constituyen el tipo de hemicelulosa más abundante en la pared secundaria de las gimnoespermas, siendo un componente minoritario en las angiospermas. Son polímeros lineales de  $\beta$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-manosa, unidos por enlaces  $\beta(1,4)$ , con predominio de las manosas, que no presentan ramificaciones ni sustituyentes laterales. Los glucomananos son típicos de hemicelulosas de maderas duras, en los que la relación glucosa:manosa es 1:2-1:3.
- Galactoglucomananos, constituidos por un esqueleto lineal de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranososa y  $\beta$ -D-manopiranososa, unidas mediante enlace  $\beta(1,4)$ . Presenta dos tipos de sustituyentes: grupos acetilo, unidos por enlace éster en las posiciones C2 ó al C3 de las hexosas, y residuos de  $\alpha$ -D-galactopiranosidos unidos por enlaces  $\alpha(1,6)$ . Este tipo de mananos es propio de hemicelulosas de maderas blandas. Además, el contenido en manosas es más elevado que en los glucomananos de maderas duras.
- Mananos y galactomananos, formados por un esqueleto de  $\beta$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta(1,4)$ , en la que los sustituyentes son residuos de  $\alpha$ -D-galactopiranososa unidas por enlaces  $\alpha(1,6)$ . Este tipo de moléculas aparece en las paredes celulares del endospermo, donde desempeña también un papel de reserva energética y absorción de agua.
- Glucurumananos, están presentes en pequeñas cantidades en numerosas especies. Consisten en una cadena lineal de manosa unidas por enlace  $\alpha(1,4)$ , y residuos de ácido glucurónico, unidos mediante  $\beta(1,2)$ , posiblemente en secuencia alternada. Las cadenas laterales incluyen xilosa y arabinosa.

Por último, dentro de las hemicelulosas también encontramos los **galactanos** y **glucanos**, entre los que se distinguen:

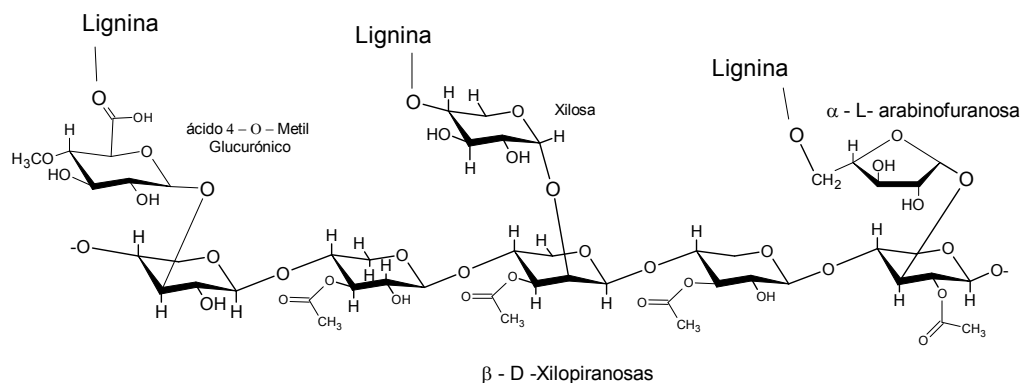
- Xiloglucanos, constituidos por un esqueleto de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta(1,4)$ , a los que se unen residuos de xilosa mediante enlaces  $\alpha(1,6)$ . Alguno de estos residuos de xilosa pueden estar a su vez sustituidos por fucosa  $\alpha(1,2)$  y por galactosa  $\beta(1,2)$ , y ocasionalmente por residuos de arabinosa. También puede presentar grupos acetilo-esterificados. Este tipo de hemicelulosas está presente en gran número de semillas, tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas, aunque en estas últimas en pequeña proporción.
- Arabinogalactanos, formados por un núcleo de galactano muy ramificado que contiene unidades de galactosa unidas por enlace  $\beta(1,3)$  y  $\beta(1,6)$ . Los residuos de arabinosa

aparecen en las cadenas externas, unidos por enlaces  $\beta(1,3)$ , junto con pequeñas cantidades de ácido glucurónico. Se localiza en la pared celular de gimnospermas.

- Callosa, es un polímero lineal de glucosa, generalmente denominado  $\beta(1,3)$  glucano, que forma una conformación helicoidal. Está presente en tejidos especializados, como granos de polen.
- $\beta(1,3)$  y  $\beta(1,4)$  Glucano, son componentes no ramificados de las paredes celulares en cereales y otras gramíneas.

Es importante resaltar la gran diferencia que existe, tanto en composición, como en estructura, entre las fracciones hemicelulósicas de los diferentes tipos de biomasa. Desde una amplia perspectiva, las maderas blandas tienen una alta proporción de manosa, como homopolímero constituyente de la cadena principal, y más cantidad de galactosa que las maderas duras; así mismo, estas últimas presentan una más alta proporción de xilosa y grupos acetilo que las maderas blandas (Dahlman y *col.*, 2003). Respecto a los materiales herbáceos se podría decir que el componente hemicelulósico es de naturaleza similar al de las maderas duras, aunque con una más baja proporción de grupos acetilo (Fengel y Wegener, 1989).

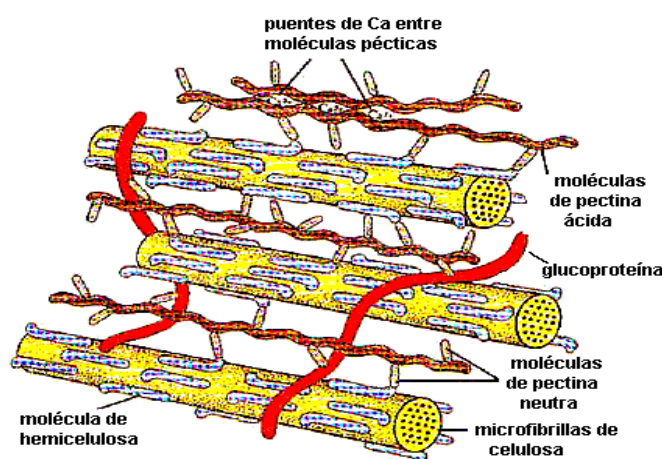
Concretamente en la paja de trigo, la xilosa es el azúcar predominante (70-75%), junto con la arabinosa (13-14%) y glucosa (6-8%) como segundo y tercer azúcares hemicelulósicos mayoritarios. Además de estos, también podemos encontrar pequeñas cantidades de galactosa (2-3%) (Sun y *col.*, 2005a). El mayor polisacárido, tanto en tamaño como en cantidad, que podemos localizar en la estructura molecular de las hemicelulosas del trigo es el arabinoxilano, que se encuentra formado por cadenas de xilano, constituidas por la unión de  $\beta$ -D-xilopiranosas mediante enlace O-glucosídico  $\beta(1,4)$  (Figura 4), a los cuales se les unen alternativamente moléculas de  $\alpha$ -L-arabinofuranosas mediante un enlace O-glucosídico  $\beta(1,3)$ . Además de la arabinosa, podemos encontrar unido a la cadena de xilanos ácido 4-O-metilglucurónico, grupos acetilo, y xilosa en las posiciones O-3 y/o O-2 de la  $\beta$ -D- xilopiranosas de la cadena de xilanos (Figura 4) y, en menor medida, pequeñas cantidades de galactosa y glucosa (Sun y *col.*, 1996; Hatfield y *col.*, 1999; Sun y Tomkinson, 2003).



**Figura 4. Modelo simplificado de la estructura de la cadena principal de arabinoxilanos de las hemicelulosas en la pared secundaria de la paja de trigo**

### 1.3.1.3 Pectinas

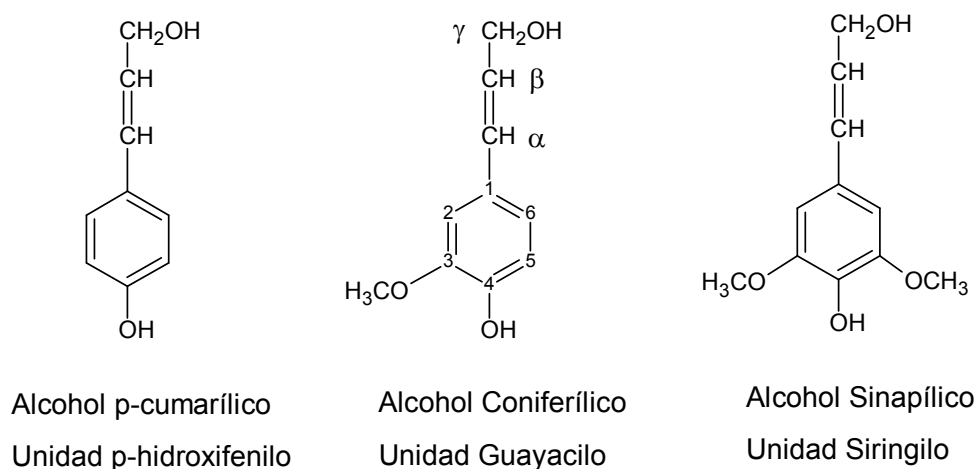
Las pectinas son heretopolisacáridos que se encuentran en las láminas medias de la pared celular de las plantas. Están compuestas de ácido D-galacturónico, D-galactosa, L-arabinosa y L-ramnosa. El cuerpo principal de este componente lo conforma un esqueleto de residuos de ácido galacturónico unidos por enlace  $\alpha(1,4)$ , sobre el cual se disponen distintas ramificaciones de residuos de ramnosa unidas por enlace  $\alpha(1,2)$  (Brett y Waldron, 1996a; Ridley y *col.*, 2001). Sobre las unidades ramificadas de ramnosa se pueden llegar a encontrar cadenas laterales de L-arabinosa y D-galactosa. Estas cadenas suelen estar unidas por iones de Calcio y/o Magnesio formando pectatos, los cuales confieren solidez a la unión entre células (Figura 5).



**Figura 5. Representación esquemática de la disposición estructural de las pectinas en la pared celular primaria de la biomasa lignocelulósica**

### 1.3.2 Lignina

La lignina se encuentra formada por una matriz arraigada de monómeros hidroxicinamínicos polimerizados, cuyos precursores son los alcoholes cinamílicos; p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, que se diferencian entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático (Figura 6). Estos precursores dan lugar a las subunidades p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo, respectivamente, que se unen a través de diversos enlaces en el polímero final, tales como, carbono-carbono y uniones tipo éter, mayoritariamente, y tipo éster.



**Figura 6. Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina**

La polimerización de estos monómeros hidroxicinamínicos durante la formación de la pared celular se produce en dos etapas, una etapa enzimática y una etapa química. En la primera los precursores son oxidados por peroxidases de la pared dando radicales fenoxilo (Evers y *col.*, 1999) que, a continuación, y durante la etapa química, reaccionan al azar entre ellos dando lugar a un patrón irregular de formación de enlaces.

La lignina realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Proporciona rigidez a la pared celular, ya que su principal función es la de endurecer y sostener las fibras de polisacáridos, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular.

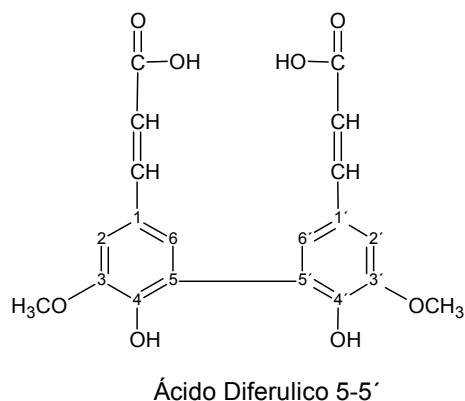
La composición de la lignina varía mucho según los diferentes grupos taxonómicos, tejido vegetal, etapa de desarrollo y condiciones ambientales. Además de la diferencia en el tipo de hemicelulosas entre las maderas duras (angiospermas leñosas), blandas (gimnospermas) y

herbáceas, también podemos diferenciarlas en cuanto a la naturaleza del componente lignina: lignina guayacil y lignina guayacil-siringil (Fengel y Wegener, 1989). La lignina de gimnoespermas (maderas blandas) contiene principalmente unidades de tipo guayacilo mientras que la lignina de angiospermas (maderas duras) contiene, además, unidades siringilo. Las unidades guayacilo restringen la humedad de las fibras, con lo que se limita también la accesibilidad enzimática en mayor medida que en las ligninas guayacil-siringil. Por otro lado, las unidades de siringilo de la lignina en las maderas duras, debido a los grupos metoxilo, reducen la formación de enlaces tipo éter y enlaces C-C, lo que se traduce en un menor grado de polimerización y condensación de este tipo de ligninas. Por este motivo, las maderas blandas son más resistentes a la deslignificación por extracción alcalina que las maderas duras.

Se pueden distinguir dos tipos de lignina dentro de la conformación estructural de la pared celular: la lignina más polimerizada y, por tanto, más condensada, formando una matriz difícil de penetrar, y la menos polimerizada, la cual se encuentra principalmente unida a las hemicelulosas (Helm y Ralph, 1992; Cornu y *col.*, 1994; Iiyama y *col.*, 1994; Lam y *col.*, 2001). La lignina polimerizada constituye por sí sola una gran incógnita debido al alto grado y a la complejidad de la polimerización existente, habiendo sido objeto de numerosas investigaciones (Smit y *col.*, 1999; Onnerud y Gellerstedt, 2003; Sun y *col.*, 2005a).

En lo que respecta a la porción de lignina menos polimerizada, se han realizado numerosos estudios para su determinación tanto cualitativa, como cuantitativa, y en todos ellos se presenta a esta porción de la lignina como la encargada de unirse a las hemicelulosas, gracias, principalmente, a su menor impedimento estérico. Los enlaces predominantes entre las dos porciones de lignina son tipo éster y éter (Helm y Ralph, 1992; Helm y Ralph, 1993; Lam y *col.*, 1994).

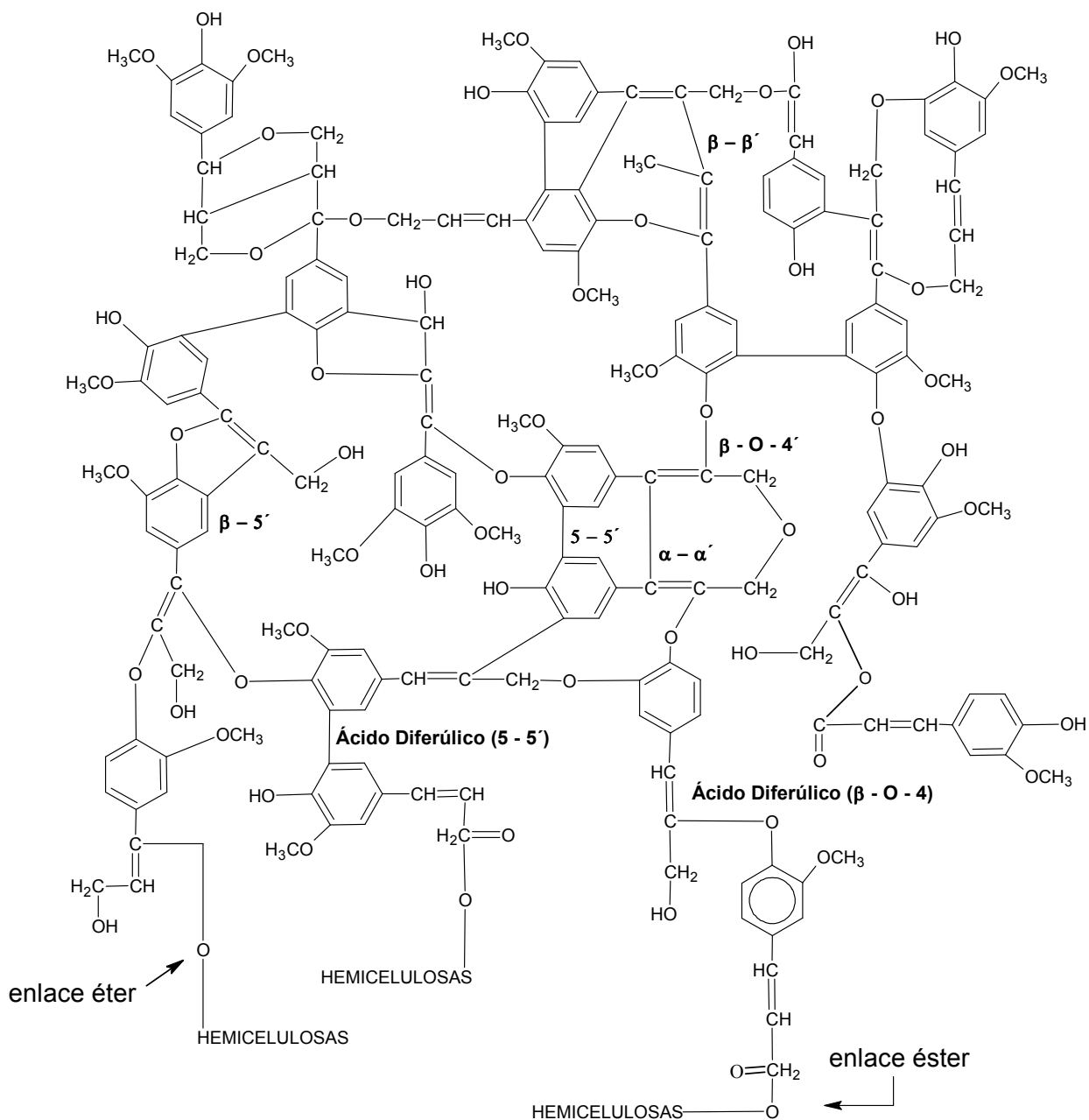
De los tres precursores hidroxicinamínicos descritos anteriormente, las unidades guayacilo juegan un papel importante en la polimerización de la lignina en la paja de trigo, así como en la unión de este componente con los polisacáridos (Zhai y Lai, 1995). Los enlaces mayoritarios en la fracción polimerizada de la lignina y responsables de la mayor condensación que presenta ésta son los formados por  $\beta$ -O-4'. Entre las interunidades, también se pueden encontrar pequeñas cantidades de enlaces  $\beta$ -5',  $\beta$ - $\alpha$ ', 5-5' y  $\beta$ - $\beta$ '. En la condensación de la lignina, también es conocido el importante papel que juegan los diferulatos (dímeros de ácido ferúlico) (Figura 7), principalmente los enlazados 5-5', y el ácido p-cumárico (Zhai y Lai, 1995), (Hatfield y *col.*, 1999). Estos tipos de enlace se encuentran formados principalmente a través de los ácidos ferúlico y diferúlico (5-5'), los cuales enlazan, vía su propio grupo carboxilo, con la porción de lignina polimerizada (Jacquet y *col.*, 1995; Hatfield y *col.*, 1999; Lam y *col.*, 2001), o mediante la contribución carboxílica procedente de dicha fracción de lignina.



**Figura 7. Ácido diferúlico 5 – 5' común en la lignina polimerizada**

Los enlaces tipo éter se originan a través de los grupos hidroxilo del anillo bencílico y de la posición  $\alpha$  de la cadena arílica de los ácidos hidroxicinamínicos precursores (Zhai y Lai, 1995; Lam y *col.*, 2001). El ácido p-cumárico y, en menor medida, el sinápico, también participan en dichos enlaces, aunque en menor cantidad que las unidades guayacilo.

Con base en los tipos de enlace descritos anteriormente y a una amplia revisión bibliográfica realizada en torno a la conformación estructural de la lignina en la paja de trigo (Iiyama y *col.*, 1990; Sun y *col.*, 1996; Sun y *col.*, 1997; Sun y *col.*, 2005a) se puede describir una aproximada estructura química para la misma, Figura 8.



**Figura 8.** Estructura propuesta de la lignina en la paja de trigo, adaptada de Sun y col, 1996, 1997, 2005 e Iiyama y col., 1990.

### 1.3.3 Otros Componentes

Formando parte de la composición de la biomasa lignocelulósica también se encuentran una serie de compuestos que debido a su heterogeneidad, y a su falta de orden estructural, se engloban en un grupo denominado *extractivos*. Una gran variedad de compuestos orgánicos conforman este grupo, tales como; grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y



complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Así mismo, son los responsables del color, olor y resistencia al marchitamiento de la planta (Fengel y Wegener, 1989).

Otro grupo de componentes lo constituyen las *cenizas*. Fundamentalmente son las sales inorgánicas de calcio, potasio y magnesio, así como sílice, que forman carbonatos, fosfatos, oxalatos y silicatos.

En cuanto a la proporción de los distintos componentes principales en la biomasa lignocelulósica, los datos son variables dependiendo del tipo del material. En la Tabla 1 se han recogido, a modo de ejemplo, datos bibliográficos de las composiciones de una serie de materiales incluyendo maderas duras, blandas y residuos herbáceos. Se puede observar que las mayores diferencias se encuentran en la cantidad y el tipo de hemicelulosa, donde, según qué tipo de biomasa, podemos encontrar mayor cantidad de xilano en los materiales herbáceos y maderas duras, y mayor cantidad de mananos en las maderas blandas. El contenido en celulosa también varía en función de la materia prima, encontrándose mayor cantidad de este compuesto en las maderas que en los materiales herbáceos.

Tabla 1. Componentes principales de diferentes materiales lignocelulósicos (% peso seco). Datos recogidos de la bibliografía

<i>Biomasa</i>	<i>Celulosa</i>	<i>Xilano</i>	<i>Manano</i>	<i>Galactano</i>	<i>Arabinano</i>	<i>Lignina</i>	<i>Referencia</i>
<i>Madera de pino</i>	46,4	7,8	10,6	n.d.	2,2	29,4	(Wyman, 1996)
<i>Madera de chopo</i>	43,5	15,5	2,5	2,3	1,5	26,2	(Negro y col., 2003a)
<i>Madera de abedul</i>	38,2	18,5	1,2	n.d.	n.d.	22,8	(Hayn y col., 1993)
<i>Bagazo de maíz</i>	36,8	22,2	n.d.	2,9	5,5	19,8	(Öhgren y col., 2007)
<i>Paja de trigo</i>	33,2	18,7	n.d.	0,8	2,8	14,3	(Ballesteros y col., 2004)
<i>Paja de cebada</i>	33,1	20,2	n.d.	0,9	3,8	16,1	(García-Aparicio y col., 2006)

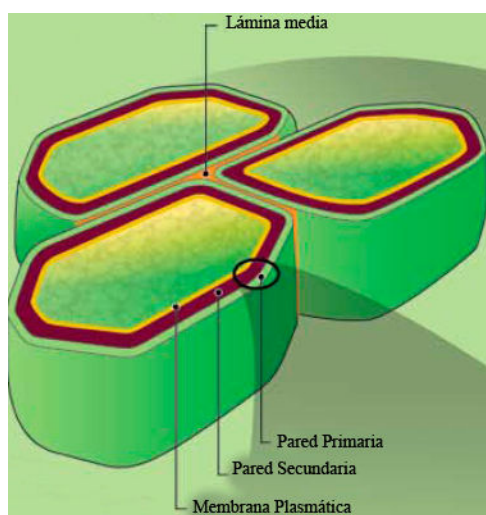
n.d.: no detectado

### 1.3.4 Disposición de los componentes principales en la pared celular vegetal

En las células vegetales la pared celular tiene un papel importante en actividades tales como absorción, transpiración, translocación, secreción, reacciones de reconocimiento y defensa contra bacterias u otros patógenos. Además, constituye una capa rígida que da forma a la célula y la protege de tracciones mecánicas. Cada pared celular está unida a la pared de las células vecinas, y entre todas constituyen un armazón que da consistencia a los distintos órganos de las plantas. Además, interviene en la creación de la presión de turgencia en el interior de las células. Esta presión es fundamental para el crecimiento, ya que los tejidos se alargan como consecuencia de la presión que ejercen las células entre sí, dando lugar a los movimientos que permiten la apertura y cierre de los estomas.

La pared celular presenta varias capas (Figura 9) que se desarrollan con la maduración celular. De fuera hacia dentro de la célula son:

- Lámina media
- Pared primaria
- Pared secundaria



**Figura 9. Representación esquemática de las distintas partes de la pared celular vegetal, modificado de (DOE, 2006)**

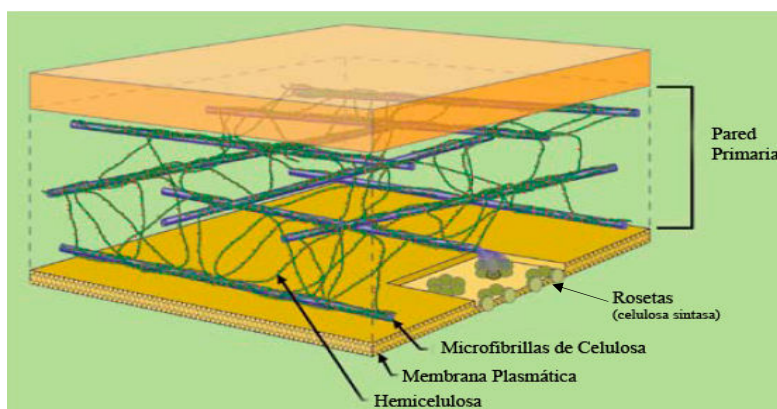
#### 1.3.4.1 Lámina Media

Cuando una célula vegetal se divide en la etapa de citocinesis, se origina una capa delgada denominada placa ecuatorial por fusión de vesículas procedentes del aparato de Golgi. A esta capa celular, amorfa y ópticamente inactiva, se le denomina lámina media. Se compone principalmente de compuestos pécticos, como el ácido péctico, formado mediante unión de moléculas de ácido galacturónico por enlaces  $\alpha(1,4)$  esterificadas con metanol. Con el tiempo, estos compuestos pierden su acidez, al unirse a iones  $\text{Ca}^{2+}$  formando pectatos (ácido péctico e iones metálicos, tales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ). La principal característica de la lámina media es su función como material aglutinante o cemento entre las paredes celulares de dos células.

#### 1.3.4.2 Pared Primaria

Cada célula vegetal construye su pared celular primaria a cada lado de la lámina media, que se expande aumentando el volumen celular mientras las células mantienen un crecimiento activo. En las células vegetales, la pared primaria es un componente dinámico que define y limita su morfología. La pared primaria de las células vegetales está compuesta principalmente de microfibrillas de celulosa (9-25%) y una matriz interpenetrante de hemicelulosa (25-50%), pectinas (10-35%) y proteínas (10%).

La pared primaria consta, básicamente, de una red de microfibrillas de celulosa, en las que docenas de cadenas lineales de glucosa se condensan para formar largos cristales que envuelven cada célula. Las cadenas de celulosa se sintetizan mediante sistemas enzimáticos de celulosa sintasa que se encuentran emplazados en la membrana plasmática en forma de rosetas. Estas rosetas se desplazan, guiadas por microtúbulos de la cara interna de la membrana. Las microfibrillas de celulosa se van alargando por el extremo unido a estas rosetas y se depositan al azar y quedan entrelazadas (Figura 10). Estas microfibrillas tienen una anchura de 5-15 nm y están distanciadas entre 20 y 40 nm (Carpita y Gibeaut, 1993). Aunque cada cadena puede constar de varias miles de unidades de glucosa, éstas comienzan y terminan en diferentes zonas dentro de la misma microfibrilla.



**Figura 10. Ejemplo esquemático de la estructura de la pared primaria de las células vegetales, modificado de (DOE, 2006)**

La microfibrillas de celulosa se encuentran enlazadas a los polisacáridos de hemicelulosas. En la formación de estos enlaces, los arabinoxilanos y arabinogalactanos hemicelulósicos presentes en la pared celular primaria serían atacados por los grupos hidroxilos de la celulosa, formando un enlace glicosídico. Estos polímeros hemicelulósicos, a su vez, se unirían a los ramnogalacturanos (pectinas), los cuales vía arabinoxilanos y arabinogalactanos volverían a enlazarse a la celulosa (Albersheim, 1975). La disposición que presentan los componentes hemicelulosa y celulosa establece la conformación estructural necesaria para que se produzcan los enlaces glicosídicos entre los hidrógenos adyacentes de los grupos hidroxilo de los glucanos y los oxígenos glicosídicos de los arabinoxilanos.

Los enlaces realizados a través de las pectinas y las extensinas (glicoproteína) confieren soporte y rigidez a la estructura de la pared primaria celular. Además también participan enzimas tales como celulasa sintasa, hidrolasas y oxidasas, necesarias para el crecimiento, modificación y lignificación durante el crecimiento secundario (Cosgrove, 1999).

#### 1.3.4.3 Pared secundaria

Continuando el crecimiento celular, y a consecuencia de una mayor polimerización de los componentes y a la incorporación y condensación de la lignina en la pared celular primaria, se origina la pared celular secundaria. La pared secundaria está compuesta principalmente de celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40%) y lignina (5-25%) (Albersheim, 1975).

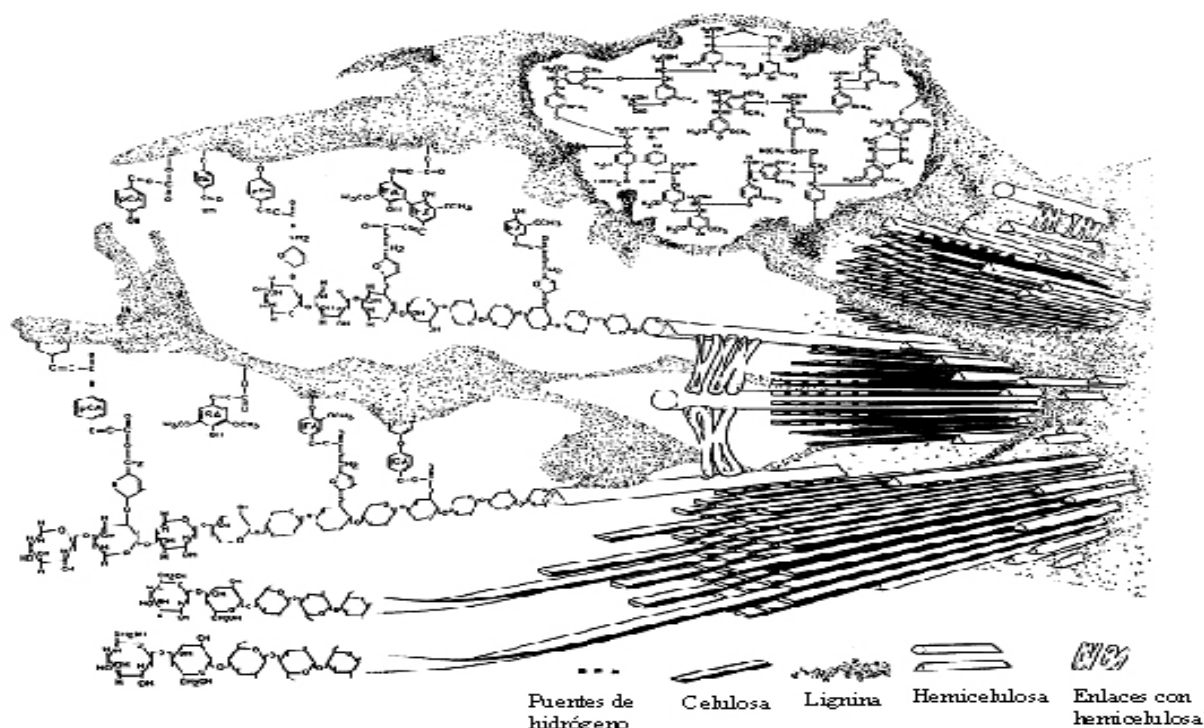
La formación de la pared secundaria se caracteriza por la síntesis masiva de celulosa, mientras que la síntesis de material pectínico cesa. Aunque los mecanismos bioquímicos parecen ser idénticos que los desarrollados en la pared primaria, no ocurre lo mismo con la longitud de las cadenas ni con la forma de deposición. Mientras que en la pared primaria el grado medio de polimerización de las cadenas de celulosa es de 2.500, en las paredes

secundarias éste aumenta hasta 14.000. Las fibras de celulosa se depositan en una orientación específica, con un fuerte empaquetamiento paralelo de las mismas.

En la pared secundaria el complejo hemicelulosa-celulosa está más estructuralmente organizado que en la pared primaria. La celulosa se encuentra unida a los azúcares hemicelulósicos mediante puentes de hidrógeno (Fengel y Wegener, 1989). Así mismo, las hemicelulosas se unen con las zonas menos polimerizadas de la lignina mediante enlaces tipo éter y éster, conformando una matriz que envuelve a la celulosa.

Una de las principales características por la que se define la pared secundaria de las células vegetales es la inclusión de la lignina, la cual le confiere a la pared celular un mayor grosor y rigidez. Durante el crecimiento celular, y en un paso previo a la formación de la pared secundaria, tiene lugar la ruta del ácido shikímico y el metabolismo fenilpropanoide, los cuales conducen a la síntesis de los monómeros constituyentes de lignina; ácidos p-cumárico, ferúlico, diferúlico, sinápico, cinámico y p-hidroxibenzoico. Posteriormente, las enzimas catalizan la formación de los tres alcoholes; p-cumárico, coniferílico y sinapílico, los cuales polimerizan entre sí dando lugar a la lignina en la pared secundaria.

Debido a la diversidad de los componentes hemicelulosa y lignina, así como a la compleja naturaleza de la matriz conformada por ambos, resulta extremadamente complicado representar la estructura de la pared secundaria de las plantas. Por ello, y en base a que el material lignocelulósico utilizado en este trabajo ha sido la paja de trigo, se muestra un esquema de la estructura de la pared secundaria en los materiales herbáceos (Figura 11), donde se representa el ordenamiento de los principales componentes descritos; celulosa, hemicelulosa y lignina. Puede observarse como las microfibrillas de celulosa y las cadenas de hemicelulosa se encuentran formando una compleja matriz estructural complementada por la lignina.



**Figura 11. Estructura de la pared celular secundaria en las células vegetales de materiales herbáceos, según (Bidlack y col., 1992)**

#### *1.3.4.3.1 Enlaces Hemicelulosa-Lignina en la pared secundaria de la paja de trigo*

Una vez se ha descrito la estructura conformacional de la pared secundaria celular de los materiales herbáceos, a continuación se describen las uniones de los azúcares hemicelulósicos a la lignina en la paja de trigo, ya que la ruptura de las mismas determinará la efectividad de la etapa del pretratamiento hidrotérmico, dando como resultado un material más desestructurado para las posteriores etapas del proceso.

Como en la mayoría de los materiales herbáceos, en la paja de trigo las hemicelulosas constituyen el segundo componente mayoritario de la pared celular (Sun y col., 1997). Este componente se diferencia de la celulosa en que está ramificado, y en que la cantidad de puentes de hidrógeno que sostienen la estructura conformacional es menor. Según se ha descrito anteriormente, el componente hemicelulósico de la paja de trigo está formado principalmente por cadenas de  $\beta$ -D-xilopiranosas sobre las cuales se encuentran enlazados monómeros de  $\alpha$ -L-arabinofuranosas mediante un enlace O-glucosídico  $\beta(1,3)$ . Además de la arabinosa, también podemos encontrar ácido 4-O-metilglucurónico, grupos acetilo y xilosa unidos a la cadena de xilanos (ver Figura 4). Es mediante estos intermediarios monoméricos, a través de los cuales se producen los principales enlaces a la lignina en la paja de trigo. Estos enlaces dependerán de los

grupos funcionales que, en todo momento, se encuentren enfrentados estéricamente, aunque se pueden agrupar en enlaces tipo éter y éster. Hay que recordar que de las dos porciones de lignina existentes, la menos polimerizada posee una mayor capacidad de movimiento y por tanto, más facilidad para formar enlaces con las hemicelulosas.

Existen numerosos estudios sobre la identificación de los intermediarios cinamílicos que intervienen en la unión de la hemicelulosa con la lignina en la paja de trigo (Iiyama y *col.*, 1990; Helm y Ralph, 1992; Helm y Ralph, 1993; Hatfield y *col.*, 1999; Lam y *col.*, 2001). La mayoría de ellos concluyen que los ácidos ferúlico (AF) y diferúlico (AD), mayoritariamente, y el p-cumárico (ApC), en menor medida, juegan un papel importante en la formación dichos enlaces. Según estas investigaciones, aproximadamente del 60 al 70% de AF y AD en la paja de trigo se encuentran enlazados mediante enlaces éter a la lignina y mediante enlaces éster y/o éter a las hemicelulosas, formando el nexo de unión entre los dos compuestos (Figura 12) (Sun y *col.*, 2002). La relación de enlaces tipo éter frente a la de ésteres presentes en las fracciones hemicelulósicas extraídas mediante disolventes tanto básicos como ácidos, determina que la mayoría de la lignina de la paja de trigo se encuentra enlazada mediante enlaces tipo éter a la arabinosa de la cadena de xilanos que conforman las hemicelulosas (Sun y *col.*, 2003; Sun y *col.*, 2005a). En lo concerniente al ácido p-cumárico, se ha descrito que se encuentra esterificado a los azúcares hemicelulósicos (Crestini y Argyropoulos, 1997), y que la mayoría de las moléculas de dicho ácido se encuentran enlazadas a través de la posición  $\gamma$  de la cadena alílica (Figura 13) (Lam y *col.*, 2001; Durot y *col.*, 2003). También existe un enlace, tipo éster, menos predominante, a través del ácido glucurónico de la cadena de xilanos que conforman la hemicelulosas. Este enlace, denominado benzil éster, se produce a través del grupo carboxilo que presenta dicho ácido en su carbono 6, hacia la posición  $\alpha$  de la cadena alílica de alguna unidad de guayacilo presente en el medio (Figura 14) (Sun y *col.*, 1997).



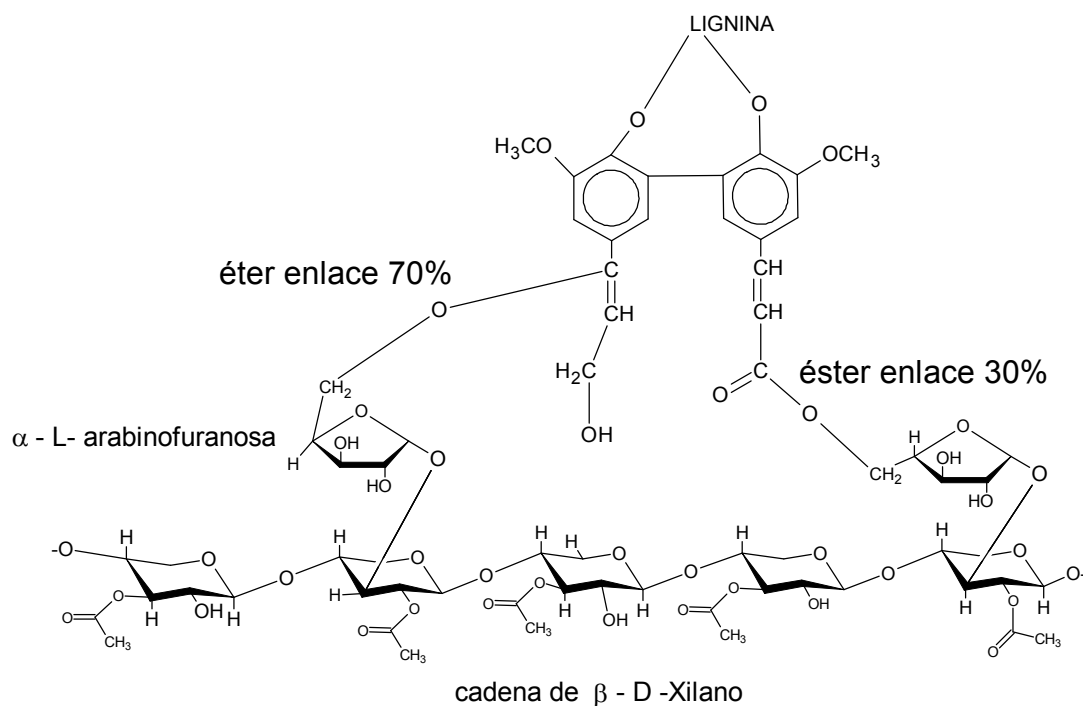


Figura 12. Representación esquemática de los enlaces éster y éter predominantes en las uniones lignina-hemicelulosa de la paja de trigo, adaptado de Sun y col., 2002

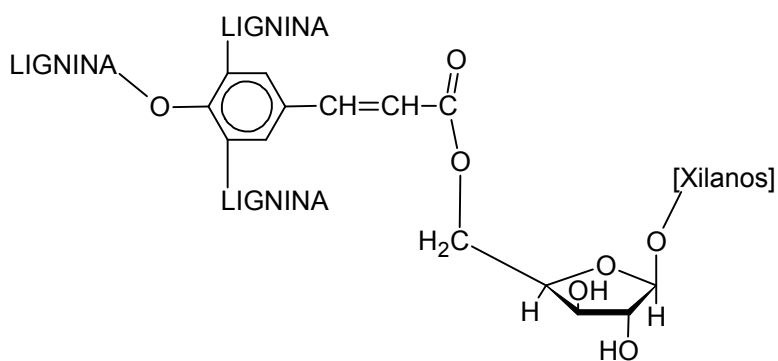
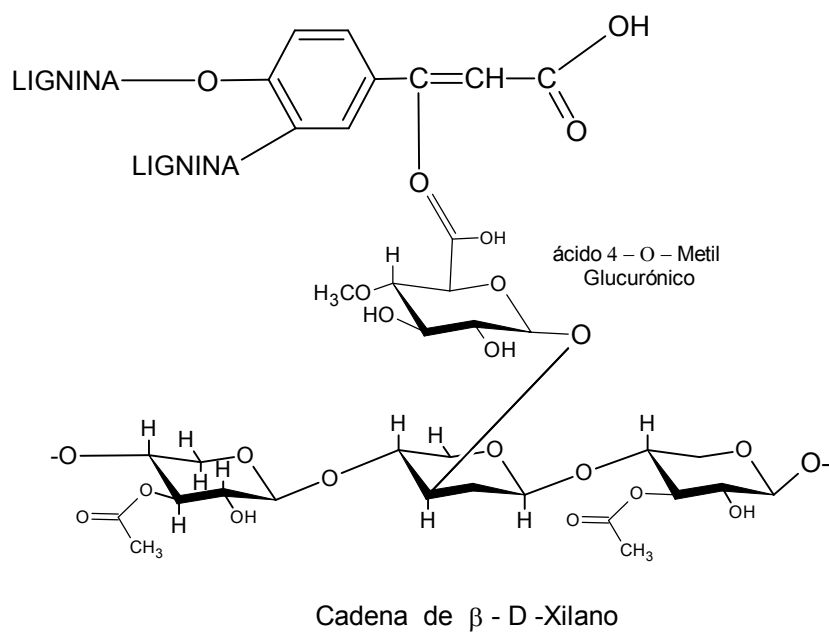


Figura 13. Enlace éster representativo entre el ácido p-cumárico y las hemicelulosas de paja de trigo adaptado de Durot y col., 2003; Lam y col., 2001



**Figura 14. Enlace éster representativo entre el ácido p-cumárico y el ácido 4-O- metil glucurónico, adaptado Sun y col., 1997**

## 1.4 PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Los carbohidratos presentes en la biomasa lignocelulósica pueden transformarse en etanol, tras un proceso de hidrólisis, mediante la acción de microorganismos fermentativos. La hidrólisis de estos carbohidratos puede llevarse a cabo con la intervención de catalizadores ácidos o enzimáticos. En un esquema general de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Figura 15), la hidrólisis de los polisacáridos que forman parte de la biomasa lignocelulósica se puede realizar de dos formas diferentes, mediante una *vía ácida o enzimática*. Una vez obtenidos los azúcares fermentables, se realiza la fermentación y posteriormente la destilación.

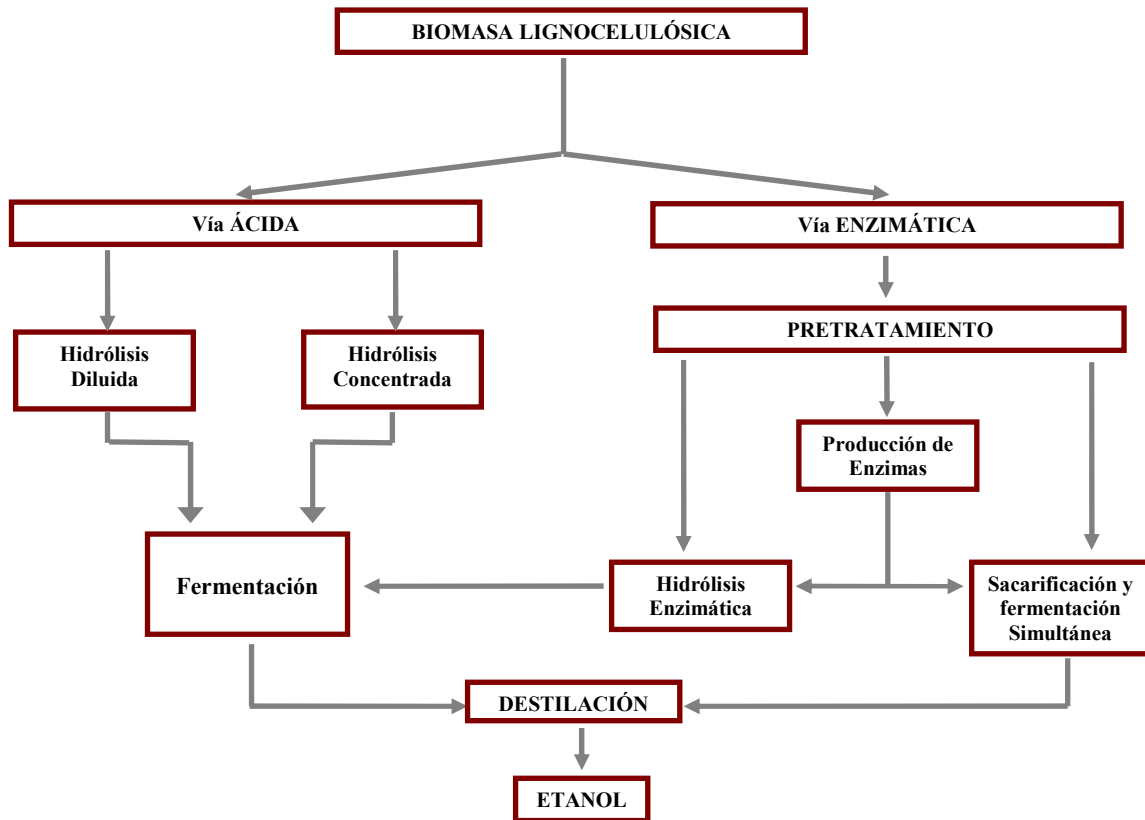
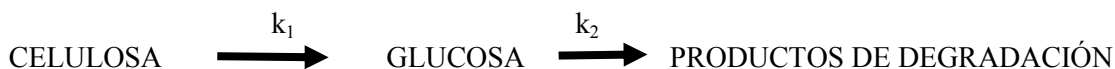


Figura 15. Esquema de las diferentes vías de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica

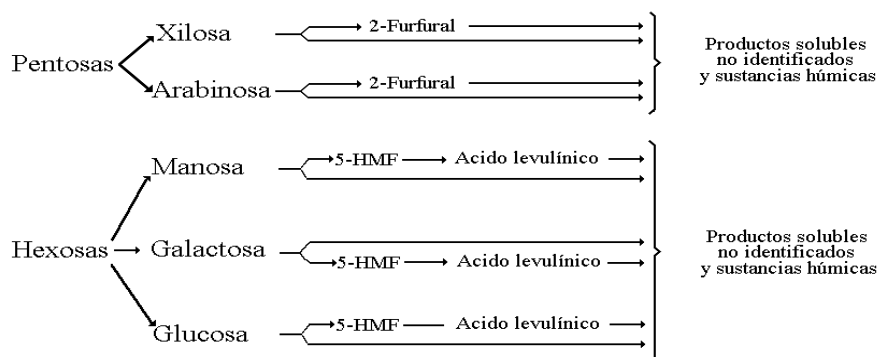
### 1.4.1 Procesos basados en hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida es un tratamiento químico que, mediante el uso de catalizadores ácidos consigue transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa en sus monómeros elementales. Como catalizadores se pueden utilizar distintos ácidos (sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, fórmico, etc.), concentrados o diluidos. La reacción básica que interviene en este proceso es la siguiente:



En el desarrollo de la reacción es importante que la relación  $k_1/k_2$  sea lo más alta posible, para poder obtener máximos rendimientos de producción de glucosa (alta hidrólisis de la celulosa y poca degradación de la glucosa).

El tratamiento de hidrólisis ácida un proceso mucho más rápido que el tratamiento enzimático, si bien la degradación de los azúcares que se produce en condiciones ácidas y altas temperaturas constituye un serio inconveniente. Los productos de degradación que se producen en este proceso termoquímico son, mayoritariamente, el 2-furfural y el 5-hidroximetil-furfural (5-HMF) (Figura 16). A temperaturas superiores a los 200 °C aparecen productos de descomposición del furfural y 5-HMF, como el ácido fórmico y el ácido levulínico, y una serie de productos solubles no identificados. En la Figura 16 se representa un modelo general de las reacciones de degradación que tienen lugar durante el tratamiento ácido. La aparición de productos de degradación de los azúcares conduce a un menor rendimiento y, además, pueden afectar negativamente al proceso fermentativo, por lo que deben ser eliminados del hidrolizado antes de realizar la fermentación.



**Figura 16. Productos de degradación de los azúcares en condiciones ácidas y altas temperaturas**

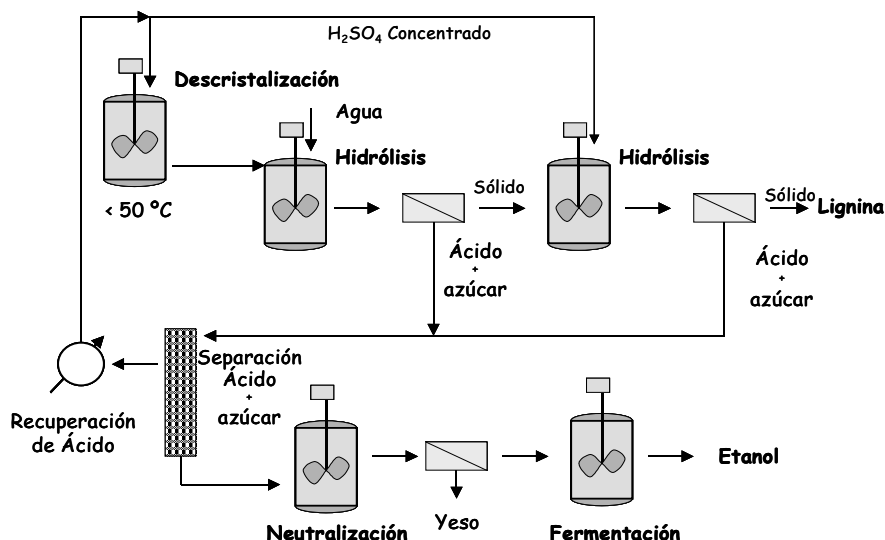
Aunque la hidrólisis de la celulosa puede ser catalizada por un gran número de ácidos, tan sólo el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico han sido aplicados a escala industrial. Los métodos industriales de hidrólisis pueden agruparse en dos tipos de procesos:

- Alta concentración de ácido y baja temperatura.
- Baja concentración de ácido y alta temperatura.

#### *Ácido concentrado*

La celulosa cristalina es soluble en soluciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% o  $\text{HCl}$  al 42% a bajas temperaturas (10-45 °C). Durante esta solubilización se producen oligosacáridos, principalmente celotetrosas, y glucosa en poca cantidad. Estas cadenas cortas pueden ser fácilmente hidrolizadas a azúcares simples en condiciones de baja temperatura (entre 100-200 °C) y tiempos entre 1-3 h para obtener los monómeros de glucosa (Figura 17). Hay una primera etapa de hidrólisis, donde se utiliza ácido concentrado y baja temperatura para solubilizar la celulosa y una segunda etapa donde disminuimos la concentración de ácido y aumentamos la temperatura para lograr obtener la glucosa que proviene de la celulosa.

Las cinéticas de hidrólisis ácida con altas concentraciones de ácido no dependen de la estructura o cristalinidad de la celulosa, y se pueden obtener rendimientos superiores al 90% de la glucosa potencial. A pesar de estos altos rendimientos, no existe ninguna planta industrial que opere mediante estos sistemas por falta de rentabilidad de los mismos. Los principales inconvenientes residen en los efectos corrosivos de los ácidos concentrados (sobre todo el clorhídrico) que obliga a realizar altas inversiones en los equipamientos, así como a las grandes cantidades de ácidos empleadas en la impregnación de los materiales y a lo costoso y difícil de su recuperación. El uso de  $\text{HCl}$  tiene una ventaja técnica sobre el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y es que es un ácido volátil y puede ser recuperado por vacío.



**Figura 17. Esquema del proceso de producción de etanol con ácido concentrado**

*Ácido diluido*

Aunque el ácido concentrado hidroliza rápidamente la celulosa sin necesitar un pretratamiento, la producción de azúcares fermentables es normalmente baja debido a la degradación de la glucosa. Por el contrario, en los procesos que utilizan ácido diluido se generan menos productos de degradación, aunque sin embargo, la tasa de hidrólisis es menor debido a la barrera que supone la estructura de las regiones cristalinas dentro de la celulosa.

Los procesos que utilizan ácidos diluidos a altas temperaturas operan aproximadamente a 240 °C utilizando como catalizador una concentración de ácido en torno al 1% y tiempos de reacción cortos (6-12 segundos). Los rendimientos obtenidos con este proceso se sitúan entre el 50-60%. Aproximadamente el 25% de los azúcares potenciales permanece sin hidrolizar en forma de celulosa y el otro 25% son degradados a furfural e HMF.

La hidrólisis de la celulosa con ácidos diluidos a elevada temperatura se produce por la conversión de hidrocelulosa a polímeros solubles y posteriormente a azúcares sencillos. En esta reacción en cadena el paso limitante es la rotura de la hidrocelulosa a polisacáridos solubles. En estos procesos se suele realizar una primera etapa de hidrólisis (prehidrólisis) donde se hidroliza la fracción de la hemicelulosa, y una segunda etapa donde se realiza la hidrólisis de la celulosa (Figura 18).

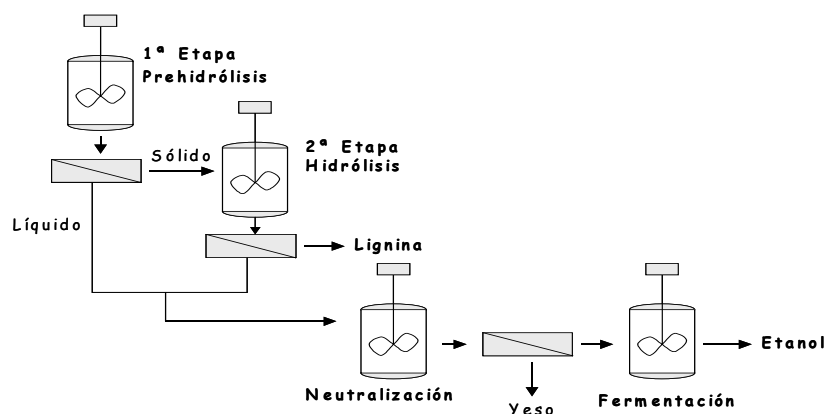


Figura 18. Esquema del proceso de producción de etanol con ácido diluido.

#### 1.4.2 Procesos basados en hidrólisis enzimática.

En la hidrólisis enzimática se utilizan catalizadores biológicos (enzimas) para romper los polisacáridos constituyentes de la biomasa lignocelulósica. Las ventajas de utilizar la hidrólisis enzimática son que las enzimas son específicas de la reacción que catalizan y que se pueden obtener altos rendimientos de hidrólisis. Las enzimas celulolíticas solo rompen los enlaces glucosídicos que unen las moléculas de glucosa, evitándose la formación de productos de degradación. Las reacciones enzimáticas tienen lugar en condiciones suaves de temperatura y pH. El grupo de enzimas responsable de la hidrólisis de la celulosa se denomina genéricamente "celulasas" y corresponde, en realidad, a una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Los procesos de producción de etanol vía enzimática constan de cuatro etapas: pretratamiento (encaminada a alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica para hacerla accesible al ataque enzimático), hidrólisis enzimática, fermentación y destilación (Figura 19).

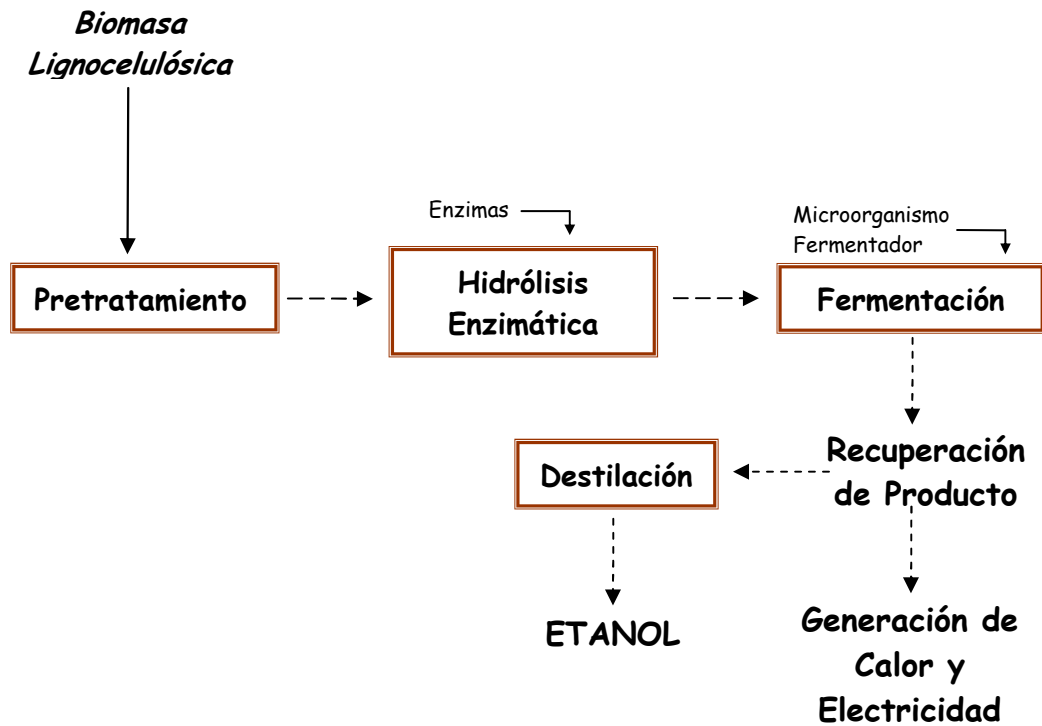


Figura 19. Esquema general del proceso de producción de etanol vía enzimática.

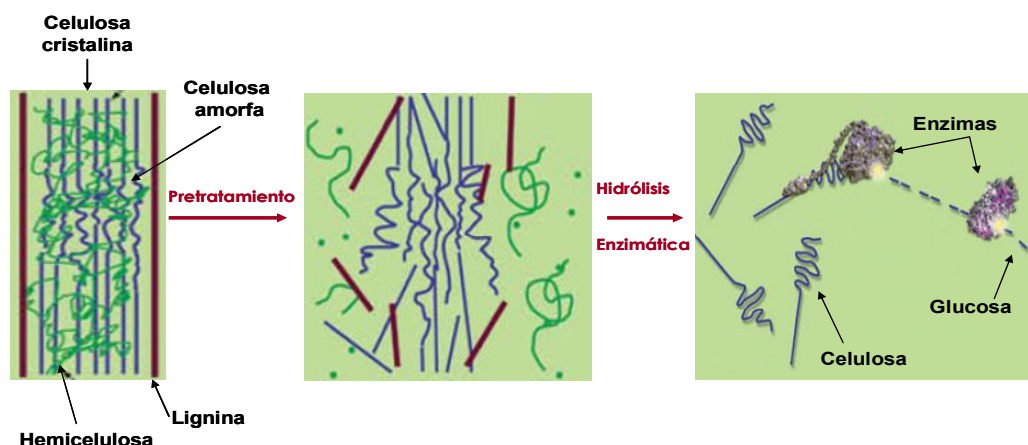
#### *Pretratamiento*

Debido a las características estructurales de los materiales lignocelulósicos, el *pretratamiento* de la materia prima es un paso esencial en los procesos de obtención de etanol vía enzimática. Es necesaria una etapa previa donde se altere, en la medida de lo posible, el entramado hemicelulosa-lignina (Wyman y *col.*, 2005) y se reduzca la cristalinidad de la celulosa, dando lugar a un material susceptible al ataque enzimático. La eficiencia del proceso global de obtención de etanol vendrá determinada por la efectividad que la etapa de pretratamiento tenga sobre la materia prima. Desde el punto de vista económico, se estima que esta etapa representa el 33% del coste total del proceso (Lynd, 1996). Por lo tanto, resulta necesario un desarrollo eficiente de las tecnologías del pretratamiento, con el objetivo de reducir los costes de obtención de etanol (Mosier y *col.*, 2005). El trabajo de tesis doctoral que aquí se presenta, está centrado en la optimización de esta etapa. Una descripción detallada de los diferentes tipos de pretratamientos disponibles y del efecto que estos producen sobre distintos materiales lignocelulósicos se presenta en el apartado 1.5.



### Hidrólisis Enzimática

Después de la etapa de pretratamiento, en la hidrólisis enzimática se utilizan enzimas específicas para acceder a los distintos polisacáridos contenidos en la materia prima. Denominadas celulasas y hemicelulasas, estas enzimas son necesarias para romper los polisacáridos celulosa y hemicelulosa en sus azúcares monoméricos constituyentes, que son susceptibles de ser fermentados posteriormente (Figura 20).



**Figura 20. Representación esquemática del proceso de hidrólisis enzimática**

Las enzimas implicadas en la degradación del material lignocelulósico son producidas principalmente por microorganismos como bacterias y hongos. A pesar de que en la naturaleza existe un vasto espectro de microorganismos productores de enzimas celolíticas, la investigación se ha centrado en algunos géneros de hongos, tales como *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, debido fundamentalmente a su capacidad para producir enzimas en grandes cantidades y de forma extracelular, lo que favorece su separación en los medios de cultivo. Concretamente *Trichoderma reesei* y sus mutantes se han utilizado ampliamente para la producción comercial de celulasas y hemicelulasas (Szczodrak, 1989; Juhász y col., 2005) en base al desarrollo de amplios programas de mejora y selección de cepas y de procesos de producción industrial que se han llevado a cabo en varios países durante los últimos años.

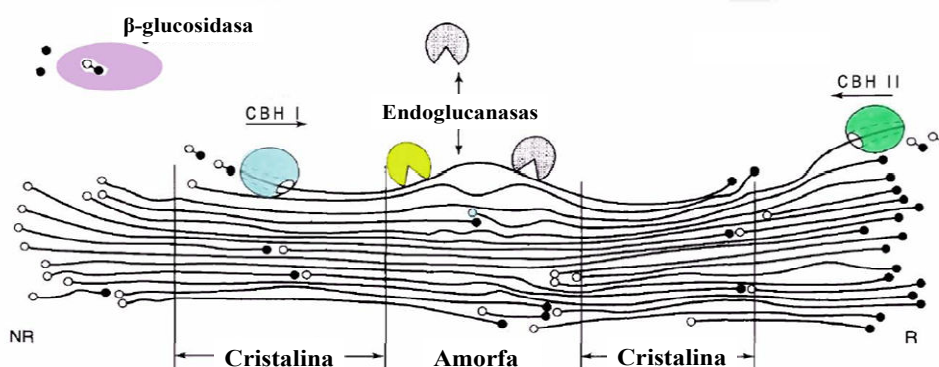
Las preparaciones comerciales de celulasas, responsables de la hidrólisis de la celulosa, están integradas por una compleja mezcla de proteínas enzimáticas con diferentes especificidades hacia los enlaces glucosídicos. Las celulasas, en función de su actividad enzimática, pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: *Endo-β-glucanasas (EGs)*, *Exo-1,4-β-glucanasas (EC 3.2.1.91)*, también llamadas celobiohidrolasas (CBH), y *β-glucosidasas (EC 3.2.1.21)*.

En general, el mecanismo más aceptado para explicar la acción de las celulasas es la acción sinérgica secuencial de las endoglucanasas y exoglucanasas sobre la celulosa (Medve y

col., 1998), aunque algunos detalles del desarrollo de dicho mecanismo no están aún del todo claros (Rabinovich M.L. y col., 2002). En la Figura 21 se muestra un esquema general del mecanismo de acción del sistema celulolítico.

Las endoglucanasas, a menudo denominadas carboximetilcelulosa (CM)-celulasas, actúan atacando, aleatoriamente, los enlaces centrales de la región amorfa del polímero de celulosa, hidrolizando enlaces  $\beta(1,4)$  y generando nuevos finales de cadena no reductores (Figura 21). Las celobiohidrolasas (CBHI y CBH II), a menudo llamadas exoglucanasas, es el mayor componente del sistema celulolítico del hongo, contabilizando un 40-70% de las proteínas celulolíticas. Las CBH actúan sobre los finales de la cadena liberando monómeros, celobiosa, y oligosacáridos de bajo peso molecular (celodextrinas) que son transformados en glucosa por la  $\beta$ -glucosidasa (Figura 21). Además, las celobiohidrolasas son capaces de hidrolizar celulosa en forma cristalina.

La  $\beta$ -glucosidasa no es estrictamente una celulasa, pero juega un papel muy importante en la hidrólisis de la celulosa a glucosa, ya que la celobiosa es un producto inhibitor de la celulasas. A su vez, la  $\beta$ -glucosidasa es inhibida por la glucosa.



**Figura 21. Esquema del mecanismo de acción sinérgico del sistema celulolítico**

La mayoría de los microorganismos productores de celulasas también son productores, aunque en menor grado, de hemicelulasas. Sin embargo, existen microorganismos que las producen en mayor cantidad, tales como: *Escherichia coli*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacter mathranii*.

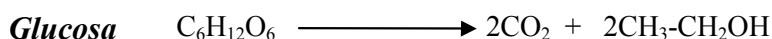
Las hemicelulasas incluyen un mayor número de grupos de enzimas que las celulasas, debido a la heterogeneidad estructural del polímero hemicelulosa. Por la alta especificidad que los enzimas presentan hacia determinados enlaces, las hemicelulasas incluyen una serie de actividades enzimáticas específicas para cada tipo de enlace presente en la hemicelulosa, tales como endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que actúan al azar en el interior de la cadena de xilano

generando oligosacáridos con diferentes sustituyentes,  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37), que liberan monómeros de xilosa de los extremos no reductores de xilooligosacáridos, y xilobiosa. También son necesarias enzimas que hidrolizan los enlaces de los sustituyentes laterales, como la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronosidasa (EC 3.2.1.139),  $\alpha$ -D-galactosidasa (EC 3.2.1.22), acetilxilanoesterasas (EC 3.1.1.72), ferúlico esterases (EC 3.1.1.73) y cumárico esterases (EC 3.2.1).

En el proceso de producción de etanol vía enzimática es importante minimizar el uso de la cantidad de enzimas usadas en la etapa de hidrólisis, siempre y cuando se consigan buenos rendimientos globales de azúcares, ya que el coste de las enzimas representa un importante porcentaje del coste global de producción de etanol. Se estima que las enzimas son responsables de, aproximadamente, el 50% del coste total del proceso de hidrólisis (Howard y *col.*, 2003).

### *Fermentación*

En el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, y después de la etapa de hidrólisis enzimática, se utiliza una fermentación para transformar los azúcares liberados en forma monomérica a etanol. La fermentación alcohólica es un proceso bien conocido que ha sido practicado por los humanos durante cientos de años para la producción de bebidas alcohólicas, como el vino y la cerveza. Este proceso bioquímico, llevado a cabo por microorganismos, es una conversión estequiométrica en la que los azúcares monoméricos, glucosa y/o xilosa son transformados en etanol y  $\text{CO}_2$ .



En base a estas reacciones, la máxima eficiencia por la que un microorganismo fermentador asimila la glucosa y la xilosa, es en 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar, aunque en la práctica resulta muy complicado llegar a estos valores, ya que las levaduras invierten cierta parte de la energía que consumen (azúcares) en el metabolismo celular y el crecimiento.

Los microorganismos generalmente empleados son las levaduras, hongos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los más utilizados en la fermentación alcohólica son

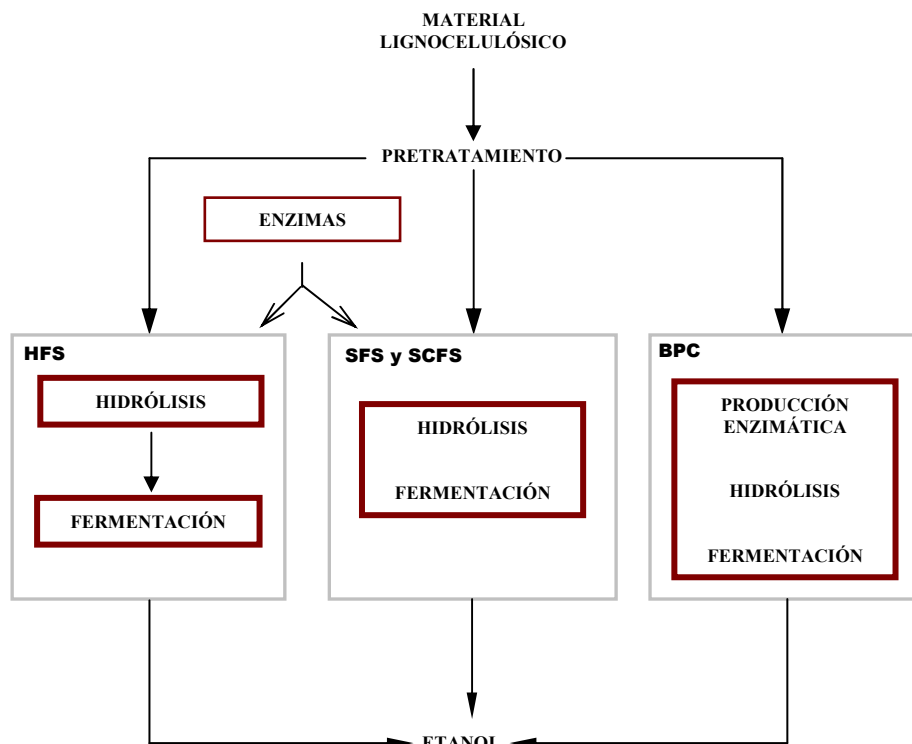
los de la familia *Saccharomyces*, si bien otros géneros como *Kluyveromyces* o *Klebsiella* también han sido objeto de estudio. La levadura más ampliamente utilizada para la producción de etanol, hoy día, es *Saccharomyces cerevisiae*. Actualmente, y dentro del proceso de producción de etanol combustible, es la única levadura usada a escala industrial gracias a su capacidad de producir altos rendimientos de etanol, y a su elevada tolerancia a los productos de inhibición que suelen originarse durante la etapa de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Lin y Tanaka, 2007). Sin embargo, esta levadura solo tiene la capacidad de fermentar hexosas, tales como la glucosa, manosa y galactosa a etanol.

Teniendo en cuenta que, como consecuencia de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática del material lignocelulósico, se genera una corriente de azúcares monoméricos de 5 carbonos (pentosas) potencialmente fermentables a etanol, resultaría esencial el aprovechamiento de estos azúcares para la viabilidad económica del proceso global (Jeffries y Jin, 2004; Sedlack y Ho, 2004). Existen en la naturaleza géneros de microorganismos capaces de fermentar las pentosas a etanol. Los más estudiados son *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Candida shehatae*, aunque los rendimientos de fermentación suelen ser bajos. Actualmente se están desarrollando investigaciones centradas en la obtención, por ingeniería genética, de microorganismos capaces de cofermentar tanto la glucosa como los azúcares procedentes de la hemicelulosa (Olsson y col., 2006; Öhgren, 2006). Este objetivo puede conseguirse siguiendo dos posibles estrategias, bien introduciendo genes implicados en el metabolismo de las pentosas en microorganismos fermentadores de hexosas, o bien mejorando genéticamente los microorganismos que poseen la cualidad de fermentar tanto pentosas como hexosas, tales como; *Escherichia coli* y *Zymomonas mobilis* (Lin y Tanaka, 2007).

Por último, y con el objetivo de mejorar la eficiencia de esta etapa, es necesario aumentar la tolerancia de los microorganismos fermentadores, tanto a los compuestos inhibidores generados durante la fase de pretratamiento, como al etanol producido en la fermentación (Aristidou y Penttilä, 2000). La optimización de los factores que afecten al rendimiento de los microorganismos fermentadores, repercutirá positivamente en la viabilidad económica del proceso global de obtención de etanol.

#### 1.4.2.1 Diferentes configuraciones de proceso para la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica vía enzimática

Dentro de los procesos de obtención de etanol por vía enzimática se han desarrollado diferentes configuraciones, dependiendo de la manera en que se lleven a cabo las etapas de hidrólisis y fermentación. Un esquema de estas configuraciones se muestra en la Figura 22.



**Figura 22. Principales configuraciones de procesos en la producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica**

Se pueden distinguir tres configuraciones principales para el proceso de obtención de etanol vía enzimática; realizar las etapas de hidrólisis y fermentación por separado (HFS), realizarlas conjuntamente en un mismo reactor, sacarificación y fermentación simultánea (SFS), con la variante de co-fermentar hexosas y pentosas (SCFS) o, por último, en una misma etapa, llevar a cabo la producción del celulasa, la hidrólisis de la celulosa y la fermentación, en los que se denominan Bioprocesos Consolidados (BPC) (Lynd y *col.*, 2005; Cardona y Sánchez, 2007).

La ventaja que ofrece realizar por separado las etapas de hidrólisis y fermentación (HFS) es que ambas pueden realizarse bajo sus condiciones óptimas de temperatura. La hidrólisis enzimática se realiza a la temperatura óptima del enzima (en torno a 50 °C), mientras que la fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo fermentador (32-35 °C). Sin embargo, el principal inconveniente de esta configuración de proceso es que la glucosa y la celobiosa liberadas durante la etapa de hidrólisis enzimática inhiben los enzimas implicados en el proceso, disminuyendo por lo tanto los rendimientos de sacarificación.

Como ejemplo de aplicación de esta configuración para la obtención de etanol se puede citar el proceso desarrollado por la corporación Iogen, el mayor fabricante de enzimas, a nivel industrial, en Canadá. En este proceso se pretrata la materia prima mediante explosión con vapor con ácido diluido con el objetivo de recuperar los azúcares hemicelulósicos, se hidroliza la celulosa y hemicelulosa, y, ya por separado, se realiza la co-fermentación de la glucosa y

xilosa liberadas mediante el uso de un microorganismo modificado genéticamente para la asimilación tanto de hexosas como de pentosas (Iogen Co., 2007).

Un esquema alternativo a la hidrólisis y fermentación secuenciales consiste en la realización del proceso en una etapa, denominado sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). En este proceso, el material pretratado es sometido, en un único reactor, a la acción de las enzimas celulolíticas y al microorganismo etanológico. En esta configuración se elimina el problema de inhibición por producto final que existía al realizar ambas etapas por separado, ya que los azúcares liberados por la acción de las enzimas, son consumidos *in situ* por el microorganismo fermentador, por lo que es posible obtener mayores tasas de sacarificación y rendimientos globales de etanol que en la configuración HFS (Olsson y *col.*, 2006). Otra de las ventajas que ofrece el proceso de SFS es que, al evitar la acumulación de los productos de hidrólisis, permite el empleo de mayores concentraciones de sustrato, necesarias para alcanzar un alto porcentaje de etanol en el medio de fermentación, que haga económicamente viable el posterior proceso de destilación (Zacchi G. y Axelsson, 1989). Además, el uso de un único reactor donde se lleven a cabo las dos etapas, representa una simplificación del proceso, reduciendo los costes de inversión. La principal desventaja que presenta esta configuración de proceso se debe a que las etapas de hidrólisis y fermentación tienen diferentes condiciones óptimas de temperatura y pH, puesto que la temperatura óptima de sacarificación se encuentra próxima a los 50 °C y las levaduras comerciales productoras de etanol trabajan en torno a 35 °C. Por ello, el rendimiento global del proceso de SFS podría verse disminuido respecto a la HFS, debido a la disminución en la actividad hidrolítica que las enzimas mostrarían a esa temperatura. Aunque cabe destacar que, por otra parte, el empleo de temperaturas menores a la óptima de hidrólisis enzimática, minimiza la desactivación térmica del sistema celulolítico a lo largo del proceso, además de disminuir el riesgo de contaminación (García-Aparicio, 2007). Para minimizar esta diferencia de temperaturas óptimas existente entre ambas etapas, es recomendable la utilización de microorganismos termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus*, que es capaz de realizar la fermentación a 42 °C, permitiendo esto trabajar cerca de la temperatura óptima de la enzima. En este sentido, *Kluyveromyces marxianus* es una de las levaduras más estudiadas en los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (Hack y Marchant, 1998; Wilkins y *col.*, 2007), habiéndose ensayado en diferentes sustratos como madera de chopo (Ballesteros y *col.*, 1998), abeto (Bollok y *col.*, 2000) y residuos de las industrias olivarera y papelería (Ballesteros y *col.*, 2001; Ballesteros y *col.*, 2002).

Actualmente, se están realizando numerosas investigaciones en base a una configuración de proceso que consiste en realizar de manera simultánea la fermentación de glucosa y xilosa, denominada sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS). Esta configuración de proceso es una modificación de la SFS a la que se le añaden las pentosas como azúcares potencialmente fermentables, lo que permite aumentar las concentraciones finales de

etanol. En las primeras etapas de investigación de este proceso, se estudiaron mezclas de cultivos, en los que se utilizaba un microorganismo fermentador de pentosas junto a otro de hexosas. Por ejemplo, el co-cultivo de *P. stipitis* y *Brettanomyces clausenii* ha sido utilizado en la SCFS de madera de chopo a 38 °C y a pH 4,8, obteniéndose, a las 48 horas del proceso, un rendimiento de 369 l de etanol por tonelada de madera de chopo (Olsson y HahnHagerdal, 1996). Una desventaja de la utilización de varios microorganismos en una sola etapa, es que éstos deben ser capaces de operar en las mismas condiciones de pH y temperatura. Dentro de esta configuración de proceso también se ha contemplado el uso de bacterias capaces de co-fermentar los azúcares presentes en la biomasa, pero los bajos rendimientos de etanol obtenidos, la formación de productos de degradación, el requerimiento de un pH neutro para el crecimiento y la intolerancia a altas concentraciones de etanol en el medio, implican desventajas importantes en el uso de estos microorganismos (Bothast y col., 1999).

Actualmente, esta configuración de proceso ha avanzado hacia la utilización de un único microorganismo, recombinado genéticamente, capaz de fermentar las hexosas y las pentosas con mayores rendimientos. Éste es el caso de la configuración de proceso que está siendo estudiada por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables en EE.UU. (NREL, 2007), el cual comprende un pretratamiento de la materia prima mediante hidrólisis ácida diluida, una hidrólisis enzimática y un proceso de SCFS utilizando el microorganismo *Zymomonas mobilis* modificado genéticamente, capaz de fermentar tanto la xilosa como la glucosa a etanol.

Otra de las configuraciones en estudio es la denominada “Bio-Procesos Consolidados” (BPC) (Lynd y col., 2005). En estos procesos, además de integrar las etapas de HE y fermentación en un único reactor, se emplearían una mezcla de microorganismos que tendrían la capacidad de producir toda la maquinaria enzimática necesaria para hidrolizar la fracción de polisacáridos contenidos en el material pretratado, y además, fermentar todos los azúcares a etanol. Hasta el momento, no existen microorganismos o combinaciones de microorganismos que puedan producir, simultáneamente, celulasas y otras enzimas en los elevados niveles requeridos, además de producir etanol con altos rendimientos, si bien existen algunos microorganismos que combinan múltiples funciones (Hamelinck y col., 2005).

## 1.5 PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Cuando la hidrólisis de la celulosa se utilizan catalizadores biológicos, se hace necesaria una etapa de pretratamiento, generalmente físico o químico, para hacer la celulosa más accesible al ataque enzimático (

Figura 23) (Ramos y *col.*, 1993). Los rendimientos de glucosa en la etapa de HE dependerán en gran medida del pretratamiento empleado y condiciones del mismo.

Entre los objetivos fundamentales del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se pueden enumerar los siguientes:

- ✓ reducir la cristalinidad de la celulosa
- ✓ disociar el complejo celulosa-lignina
- ✓ aumentar el área superficial del material
- ✓ minimizar la presencia de sustancias que puedan dificultar los posteriores etapas de hidrólisis y fermentación
- ✓ recuperar la mayor cantidad posible de azúcares hemicelulósicos
- ✓ minimizar la pérdida del material original

Además, un pretratamiento eficaz debe reunir una serie de características como son: un bajo consumo energético, bajos costes de inversión, la utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables y tener la posibilidad de aplicarlo a diversos sustratos.

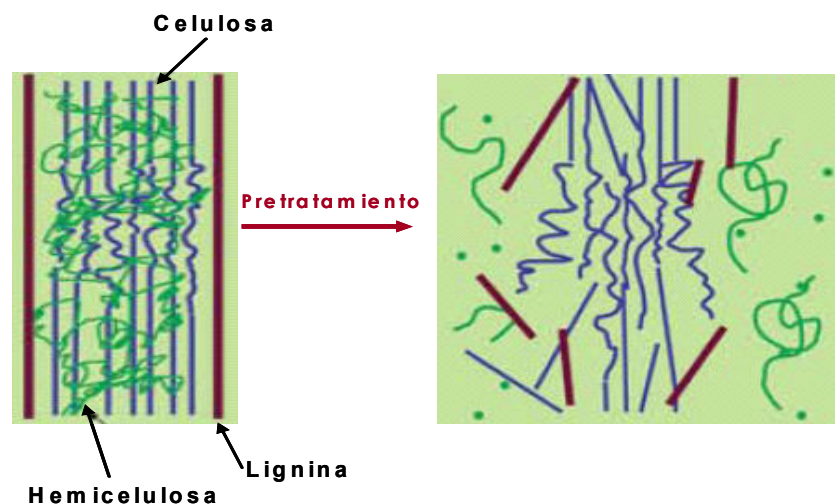


Figura 23. Esquema del modo de acción del pretratamiento de los materiales lignocelulósicos (DOE, 2006)



Desde un punto de vista de su aplicabilidad, Van Walsum y *col.* (1996), describen como principales factores que determinan la efectividad de un pretratamiento, los siguientes:

- el grado de reactividad de la fibra
- la recuperación de pentosas
- el grado de inhibición que el hidrolizado puede provocar en el crecimiento del microorganismo
- el tamaño de partícula requerido
- costes económicos asociados al equipamiento
- la generación de productos residuales

El incremento de la reactividad de la fibra se consigue mediante una serie de mecanismos como la solubilización de las hemicelulosas, la extracción de la lignina, la reducción del tamaño de partícula y la alteración de las características estructurales de la celulosa, tales como el grado de polimerización y la cristalinidad.

Uno de los indicadores de la efectividad del pretratamiento es conseguir la máxima recuperación de todos los azúcares fermentables, entre los que constituyen una parte importante la fracción de pentosas. Actualmente se está realizando un importante trabajo de investigación sobre las posibilidades de fermentación de estos azúcares mediante microorganismos convencionales manipulados por ingeniería genética (Hahn-Hägerdal y *col.*, 2007; Chu y Lee, 2007), cuya aplicación indudablemente contribuirá a equilibrar el balance económico del proceso global.

Los organismos usados para la fermentación a etanol pueden ser inhibidos por los productos de degradación producidos durante el pretratamiento. Estos compuestos de inhibición, que proceden de la degradación o hidrólisis de diferentes componentes de la biomasa, tales como azúcares, extractivos y lignina, serán comentados en mayor detalle más adelante. Si durante el pretratamiento se consigue minimizar la formación de estos compuestos, se obviaría la necesidad de detoxificar o lavar el material que se hace preciso para evitar los efectos negativos sobre el enzima y la inhibición de la fermentación, todo ello contribuyendo a una mayor eficiencia del proceso de obtención de etanol.

No todos los pretratamientos requieren el mismo tamaño de partícula. Los costes y los requerimientos energéticos aumentan considerablemente conforme disminuye el tamaño de partícula requerido. Concretamente para los pretratamientos con ácido diluido, se requiere moler por debajo de 1 mm de tamaño de partícula, representando estos costes sobre un tercio de la potencia energética requerida para el proceso total (DOE, 1993).

En lo que a los costes asociados al equipamiento se refiere, el tamaño del reactor vendrá determinado por el tiempo de residencia y la concentración de sólidos. El requerimiento de los

materiales a usar con un determinado pretratamiento es dependiente de la severidad de las condiciones de proceso (temperatura, tiempo de residencia, adición de agentes hidrolíticos, etc.), así como de las características estructurales de la materia prima. Una elevada reactividad de la fibra y concentración de sólidos reducen el tamaño del equipamiento a utilizar y la inversión necesaria. Otro de los costes asociados al pretratamiento radica en la producción de residuos generados como consecuencia del uso de compuestos ácidos y/o básicos como agentes hidrolíticos, los cuales deben ser neutralizados para su posterior tratamiento, con el consiguiente coste adicional que ello conlleva.

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (Sun y Cheng, 2002).

### **1.5.1 Pretratamientos físicos**

De manera general, es necesario tratar previamente el material lignocelulósico hasta un cierto tamaño para facilitar su posterior manejo. Los pretratamientos físicos se basan en fuerzas de impacto y cizalladura que alteran el material original. Entre ellos podemos encontrar los siguientes tipos.

#### **1.5.1.1 Trituración mecánica**

El material lignocelulósico se pretrata mediante a una combinación de trituración y molienda que reduce la cristalinidad de la celulosa, aumenta la superficie específica y densidad aparente, y facilita la hidrólisis posterior. Existen diferentes tipos de moliendas, basadas en la utilización de molinos de bolas, de martillos, de cuchillas y de rodillos, entre los más utilizados. Este tipo de pretratamiento tiene el inconveniente de su alto consumo energético, que depende tanto del tamaño final de partícula al que se muele el material, como del tipo de material a triturar (Cadoche y López, 1989).

#### **1.5.1.2 Molienda comprimida**

En este tratamiento se realiza una molienda del material en el interior de un dispositivo sometido a una sobrepresión. El resultado es un material más homogéneo que el producido con una simple molienda, y en un tiempo más corto (Tassinari y *col.*, 1982).

### 1.5.1.3 Radiación de alta energía

Este tipo de tratamiento rompe los enlaces  $\beta$ -glucosídicos y los enlaces entre la celulosa y la lignina. Debido a la baja densidad de los materiales a tratar y las altas dosis requeridas, este tipo de pretratamiento es de difícil aplicación, ya que obligan al diseño de instalaciones muy complejas y de alto coste.

## 1.5.2 Pretratamientos físico – químicos

### 1.5.2.1 Explosión por vapor

El pretratamiento con vapor a alta presión combina los efectos producidos por las altas temperaturas y presiones junto con una brusca descompresión posterior. El efecto de este pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (disgregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). El material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 180-240 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. La introducción del vapor dentro de la estructura del material lignocelulósico se favorece gracias a que la difusión de la fase vapor es de mayor magnitud que la difusión de la fase líquida. El vapor penetra en la biomasa, luego se condensa y queda en fase líquida por la elevada presión. Esta agua capilar se encuentra en equilibrio debido a la alta presión existente. Tras el tiempo de tratamiento, se somete el material a una brusca despresurización. El efecto mecánico, que radica en la rápida evaporación del agua interna causada por esta despresurización, crea unas fuerzas de cizalladura que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones más débiles (celulosa amorfa). El efecto químico se debe a la hidrólisis de los restos acetilos de las hemicelulosas produciendo ácido acético, que a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante el tratamiento se produce la alteración estructural de los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. La hemicelulosa se despolimeriza en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones del tratamiento, siendo fácilmente recuperada por lavado.

Existen numerosas referencias bibliográficas sobre el pretratamiento de explosión por vapor en materiales lignocelulósicos. Se ha descrito su efectividad en el fraccionamiento de biomasa como álamo (Negro y *col.*, 2003a; Li y *col.*, 2007), eucalipto (Nunes y Pourquié, 1996; Emmel y *col.*, 2003), paja de arroz (Moniruzzaman, 1996), residuos herbáceos (Ballesteros y *col.*, 2004), residuos oleícolas (Rodríguez y *col.*, 2007) y bagazo de caña de azúcar (Martín y *col.*, 2006), entre otros. Sin embargo, se ha mostrado menos efectivo en

maderas blandas (San Martín y *col.*, 1995; Negro y *col.*, 2003b), donde el contenido en grupos acetilos es menor y el proceso de autohidrólisis no ocurre de igual. En este tipo de materiales es deseable añadir un catalizador ácido.

Entre las principales ventajas que presenta este pretratamiento cabe citar que el tamaño de partícula requerido es superior a los utilizados en otros métodos, que no emplea catalizadores químicos (excepto para maderas blandas) y que es uno de los pocos que ha sido desarrollado a escala industrial. Su principal limitación es que se produce una cierta destrucción de una parte de las hemicelulosas y la generación de compuestos que pueden afectar negativamente a las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación.

#### 1.5.2.2 Pretratamiento con agua caliente en fase líquida (PACL)

Este pretratamiento consiste en someter la biomasa a la acción del agua caliente, en estado líquido, en un reactor a presión durante un tiempo determinado. La temperatura suele estar comprendida entre 160° y 240 °C (Van Walsum y *col.*, 1996).

Las principales variables que afectan a este tipo de pretratamiento son; la temperatura de proceso, el tiempo de residencia y la cantidad de materia prima introducida en el reactor. El control del pH durante el pretratamiento es un factor a tener en cuenta, ya que para minimizar la degradación de los monómeros, se debería de mantener en valores por encima de 4. De no ser así, se estaría desplazando el efecto del pretratamiento hacia una excesiva degradación de los azúcares monoméricos, y por tanto, hacia la formación de compuestos inhibitorios no deseados.

En este pretratamiento puede implementarse una sobrepresión en el reactor para mantener el agua en estado líquido a elevadas temperaturas, (Mok y Antal, 1992; Walch y *col.*, 1992), es decir, desplazar el equilibrio líquido-vapor del interior del reactor hacia la formación de la fase líquida. Este tipo de pretratamiento ha sido llamado hidrotermólisis (Bobleter y *col.*, 1981), fraccionamiento acuoso o vapor-acuoso (Bouchard y *col.*, 1990), y solvolisis no catalizada (Mok y Antal, 1992).

##### 1.5.2.2.1 Modo de acción

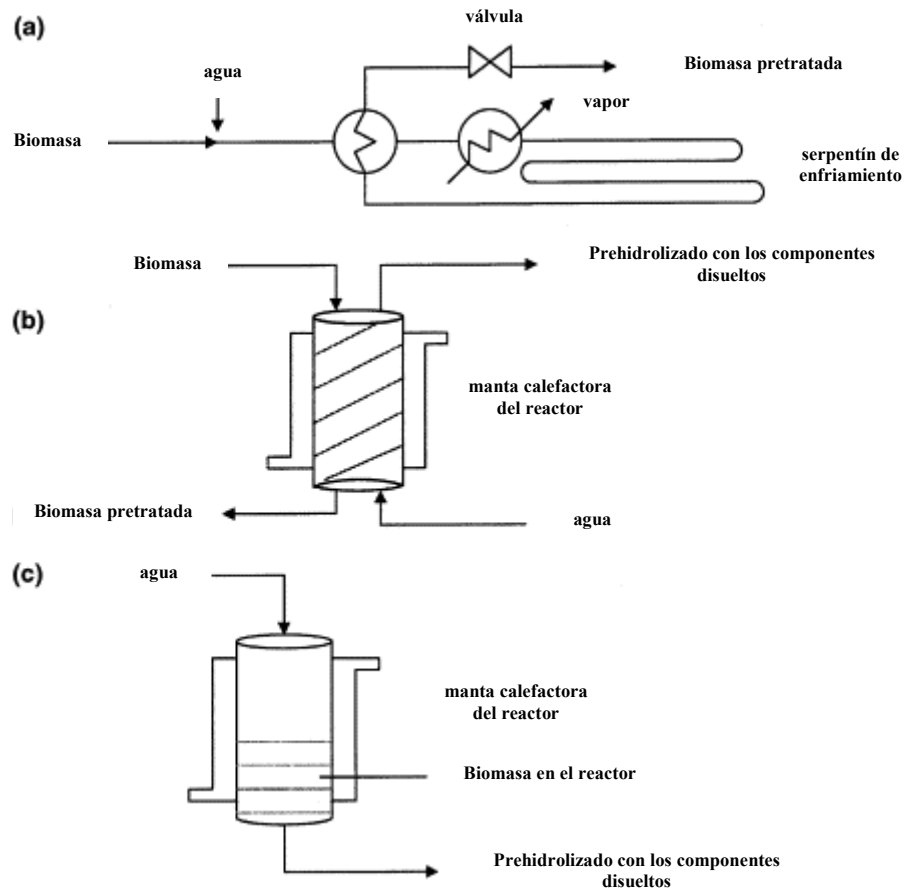
El principal desencadenante de las reacciones de hidrólisis que tienen lugar durante el pretratamiento es el agua. Las variaciones de temperatura afectan al  $pK_a$  del agua, de forma que el pH del agua pura a 200 °C es cercano a 5 (Weil y *col.*, 1998), lo que provoca una ligera acidificación del medio. En este sentido, el valor de la constante dieléctrica que presenta el agua a elevadas temperaturas es capaz de ionizar sustancias, y por consiguiente, disociarlas. El agua rompe los enlaces tipo éster que unen los grupos orgánicos, O-acetilos, al heteropolímero principal constituyente de las hemicelulosas. El equilibrio químico de estos grupos en

disolución está desplazado hacia la formación del ácido correspondiente, el ácido acético, el cual presenta la capacidad de hidrolizar determinados enlaces presentes en la biomasa (Garrote y *col.*, 2002). La alteración estructural del material lignocelulósico va incrementando gradualmente a medida que aumenta la severidad del pretratamiento, dando lugar a la liberación de otros grupos orgánicos que en disolución generan los correspondientes ácidos, que junto con el acético, catalizan la ruptura de los principales enlaces presentes en la biomasa. La mayoría de las hemicelulosas son extraídas de la materia prima como consecuencia de la acción conjunta del efecto hidrolítico del agua y los ácidos orgánicos formados en la fase líquida. Sin embargo, un efecto continuado de la elevada temperatura sobre los monómeros constituyentes del componente hemicelulósico que se van solubilizando, produce la degradación de éstos en compuestos de más bajo peso molecular, tales como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, pudiendo llegar a inhibir a los microorganismos fermentadores (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Igualmente, se produce la liberación de determinados compuestos que forman parte de la lignina, tales como la vainillina, y los ácidos ferúlico y cumárico, entre otros, que también pueden afectar a las etapas posteriores.

#### 1.5.2.2.2 Configuraciones de proceso

Dependiendo de la manera en la que la biomasa y el agua entren en contacto, existen tres tipos de configuraciones en este pretratamiento: corriente compartida (a), corriente inversa (b) y flujo a través (c) (Figura 24) (Mosier y *col.*, 2005).

En la configuración de *corriente compartida*, Figura 24a, la materia prima y el agua se calientan en el reactor a la temperatura deseada y la mezcla se mantiene a dicha temperatura durante un tiempo de residencia determinado. La biomasa pasa a través de los intercambiadores de calor, hasta alcanzar la temperatura deseada (140-180 °C), y se mantiene durante un tiempo variable de 15-20 min. Transcurrido este tiempo, la biomasa pretratada pasa a través de un serpentín aislado para su enfriamiento. El calor desprendido es aprovechado para calentar el nuevo material que entra al proceso. El resultado final es una biomasa pretratada, en la cual se ha conseguido alterar la estructura inicial de la celulosa y hacerla más accesible al ataque enzimático (Beery y *col.*, 2000).



**Figura 24. Diferentes configuraciones de proceso para el pretratamiento con agua caliente líquida (Mosier y col., 2005)**

En la configuración de *corriente inversa*, (Figura 24b), el reactor está diseñado para que la biomasa y el agua circulen en dirección opuesta en el interior del reactor, el cual se encuentra cubierto por una manta calefactora, facilitando la extracción de los componentes solubilizados. La temperatura, la sobrepresión y el tiempo de residencia son las principales variables a manejar. Éstas varían entre 180-240 °C, 0-50 bares y 5-40 min, respectivamente.

En una configuración de *reactor de flujo a través* (Figura 25c), el agua caliente pasa sobre un lecho fijo de biomasa, hidrolizando y disolviendo los componentes lignocelulósicos. Esta configuración se puede disponer de manera discontinua o continua, en referencia al flujo acuoso. Las tecnologías de flujo a través pasan agua caliente a una temperatura de 160-240 °C, y utilizan una sobrepresión, como en el de corriente inversa, con el fin de mantener el agua en estado líquido. El porcentaje de azúcares solubilizados en la fase líquida procedentes de las hemicelulosas, en comparación con las otras configuraciones descritas, es menor. El sólido resultante apenas presenta pérdidas de celulosa y lignina respecto a la materia prima inicial y además muestra una alta digestibilidad enzimática (Torget y col., 1998).

La configuración flujo a través está muy extendida entre los pretratamientos hidrotérmicos por la facilidad de implementar sobre este dispositivo la adición de un agente externo que ayude en la hidrólisis de los componentes de la materia prima. Los principales agentes hidrolíticos utilizados suelen ser ácidos ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ) y bases ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , amoníaco).

#### 1.5.2.3 Pretratamientos con amoníaco

Los agentes básicos, como los hidróxidos de sodio y calcio, son reactivos de elevado coste económico, además del inconveniente añadido que implica la recuperación de éstos después del pretratamiento (Eggeman y Elander, 2005). Sin embargo, recientemente se ha visto que el tratamiento con amoníaco puede ser una alternativa económica al uso de agentes alcalinos en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, gracias a que su alta volatilidad favorece las labores de reciclaje del mismo, además, por supuesto, de mejorar la digestibilidad enzimática (Mosier y *col.*, 2005).

Los principales procesos que utilizan agentes hidrolíticos básicos amoniacaes en su tecnología son; el proceso de explosión por vapor con amoníaco (AFEX, del inglés: ammonia fibre/freeze explosion), percolación reciclada de amoníaco (ARP, del inglés: ammonia recycle percolation).

El AFEX es un proceso similar a la explosión por vapor en el que la biomasa es impregnada con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a una temperatura en torno a los 90 °C, durante un tiempo aproximado de 30 minutos. Transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión (Dale y *col.*, 1999). Este proceso modifica las características estructurales de la lignina, favoreciendo el acceso de las enzimas celulolíticas. En el contexto de hacer más accesible la estructura de la biomasa al ataque enzimático, el AFEX también despolimeriza las hemicelulosas, debido principalmente al papel de la catálisis básica vía hidróxido amónico. Las biomosas lignocelulósicas de naturaleza herbácea se ajustan bien a este tipo de pretratamiento, actuando moderadamente sobre maderas duras, y no siendo recomendable utilizarlo sobre maderas blandas (Himmel y *col.*, 1997).

El ARP es un pretratamiento que utiliza amoníaco acuoso en un reactor tipo flujo a través. En éste se introduce una solución de amoníaco en agua entre el 5-15% en peso, la cual se hace pasar a través de la biomasa a temperaturas comprendidas entre 150-180 °C (Kim y *col.*, 2003; Tae y *col.*, 2006). Después del pretratamiento se separa y recicla el amoníaco. Bajo estas condiciones, el amoníaco acuoso reacciona en primer lugar con la lignina (no con la celulosa), causando su despolimerización y rompiendo los enlaces entre la lignina y los carbohidratos. Se ha descrito un alto grado de desestructuración del material en experiencias con maderas duras

(Yoon, 1998) y residuos agrícolas (Iyer y *col.*, 1996). Este pretratamiento ha resultado menos eficiente sobre el residuo de pulpa molida de maderas blandas (Kim y *col.*, 2000).

En el ARP, en configuración flujo a través, se requiere una gran cantidad de líquido circulando sobre la materia prima, por lo cual los requerimientos energéticos aumentan. Con el fin de minimizar estos costes económicos, surge un proceso llamado impregnación amoniacal acuosa (SAA, de inglés: soaking in aqueous ammonia). En SAA, la biomasa es impregnada con el amoníaco acuoso y calentada en un reactor discontinuo a temperaturas moderadas (25-60 °C) bajo presión atmosférica. Se suelen obtener resultados similares al proceso ARP. El SAA solubiliza la mayor parte del componente lignina, dando lugar a un residuo rico en hemicelulosas y celulosa (Kim y Lee, 2005).

Tanto el valor económico del amoníaco como los costes asociados a su recuperación, determinan el coste de este pretratamiento (Holtzapple y *col.*, 1994). Sin embargo, el balance económico del proceso está influenciado por el rendimiento total de azúcares obtenido, que a su vez, está íntimamente ligado con la formación de productos de degradación formados durante el proceso. Las temperaturas moderadas (<90 °C) y valores básicos de pH en los tratamientos con amoníaco minimizarán la formación de productos de degradación contribuyendo a la efectividad del mismo.

#### 1.5.2.4 Oxidación húmeda

En este pretratamiento la biomasa se somete a la acción de agua a elevadas temperaturas (160–180 °C) en presencia de oxígeno, añadido como sobrepresión en el reactor. También existe la variante básica para este pretratamiento, que consiste en la adición de una sustancia alcalina, como puede ser el carbonato sódico,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , con el objetivo de aumentar la severidad sobre la lignina (Palonen y *col.*, 2004). El porcentaje de solubilización de hemicelulosas suele ser más alto que el de lignina, referido a la materia prima (Schmidt y Thomsen, 1998), en comparación con otros tipos de pretratamientos. La oxidación húmeda fracciona el material inicial en una fracción sólida rica en celulosa y otra fracción líquida rica en azúcares hemicelulósicos, presentando bajas concentraciones de compuestos inhibidores. La celulosa obtenida presenta un alto grado de desestructuración, lo cual conduce a altos rendimientos de hidrólisis enzimática. Este hecho ha sido descrito por Martín y *col.* (2006), en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar, donde se obtuvieron rendimientos en HE del 89%. Este proceso tiene la ventaja de realizar varias reacciones (hidrólisis alcalina, oxidación, extracción de hemicelulosas) en una única etapa, mientras que otros pretratamientos necesitan dos o más etapas, además de no generar altas concentraciones de productos de degradación, como furfural e HMF (Klinke y *col.*, 2003; Varga y *col.*, 2003).



#### 1.5.2.5 Pretratamiento con microondas

Este pretratamiento se basa en la acción de las microondas sobre el material lignocelulósico que se encuentra suspendido en una solución acuosa. El principal fenómeno ocurrido y causante de la desestructuración de la biomasa es la autohidrólisis, producida por la liberación de los grupos acetilos de las hemicelulosas, como consecuencia del efecto del calentamiento del agua producido por las microondas. Con el objetivo de potenciar el efecto de las microondas sobre la materia prima, y aumentar la alteración estructural sufrida por la materia prima, se puede añadir un agente hidrolítico, ya sea un ácido o una base (Mitani y *col.*, 2006). Zhu y *col.* (2006), pretrataron la paja de trigo introduciéndola en una solución básica (NaOH) y sometiénola a la acción de las microondas durante 60 min. El residuo generado fue sometido a un proceso de SFS en el que se obtuvieron rendimientos de producción de etanol del 68% sobre el teórico.

#### 1.5.2.6 Pirólisis

La pirólisis consiste en la descomposición físico-química de la materia orgánica bajo la acción del calor y en ausencia de un medio oxidante. Los productos de pirólisis son gases, líquidos y residuos carbonosos cuyas cantidades relativas dependen de las propiedades de la biomasa a tratar y de los parámetros de operación del equipo. La pirólisis se considera lenta, cuando se realiza a temperaturas entre 300 y 600 °C, y rápida, cuando se realiza entre 600 y 900 °C. En pirólisis rápidas, la celulosa rápidamente se descompone en productos gaseosos y residuos quemados. Cuando se produce a temperaturas menores, esta descomposición es más lenta, produciendo compuestos menos volátiles, los cuales pueden someterse a una hidrólisis suave (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 97 °C, durante 2,5 h.) produciendo 80-85% de azúcares reductores (Sun y Cheng, 2002). Este tratamiento ha sido investigado sobre el residuo de algodón, sobre el cual se realizó una pirólisis lenta (400 °C, p = 1 mmHg, 20 min), obteniendo un residuo que, tras una hidrólisis suave (0,4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 °C y 20 min), fue fermentado a etanol mediante *Saccharomices cerevisiae*, con un rendimiento final de 0,45 g/g de glucosa (Yu y Zhang, 2003).

### 1.5.3 Pretratamientos químicos

Entre los pretratamientos químicos se encuentran el tratamiento con agentes ácidos, básicos, agentes oxidantes y organosolventes.

### 1.5.3.1 Pretratamientos ácidos

Los agentes hidrolíticos ácidos más comúnmente utilizados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica son; el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ).

La utilización de *ácido sulfúrico* diluido en el pretratamiento resulta efectiva cuando se utilizan niveles de ácido por debajo del 1% en peso. Este ácido puede ser añadido mediante impregnación de la materia prima antes de ser introducida en el reactor, o añadido en el momento en el que se alcanzan las condiciones de temperatura y presión de trabajo. Las condiciones experimentales a las que se suele trabajar en este pretratamiento varían entre valores de 0,5-1% en peso para la concentración de ácido, y valores comprendidos entre 140-190 °C para la temperatura (Wyman y *col.*, 2005). En este tipo de pretratamiento se extrae mayor cantidad de azúcares hemicelulósicos, en forma monomérica, que en aquellos que no utilizan la adición de un agente hidrolítico externo. Así mismo, se produce la alteración estructural del componente lignina que facilita el ataque enzimático de la celulosa (Yang y Wyman, 2006). A pesar de los efectos positivos descritos, el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido resulta costoso desde el punto de vista de los materiales a utilizar en la construcción de los dispositivos experimentales. La neutralización y el acondicionamiento del hidrolizado antes de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación, constituye otro factor negativo en el plano económico (Torget y *col.*, 1998; Wyman, 2007).

Una alternativa al uso de ácido sulfúrico directamente sobre la biomasa lignocelulósica, es la utilización de *dióxido de azufre*,  $\text{SO}_2$ . El gas es introducido en el reactor y mediante una válvula y un manoreductor se consigue controlar la presión interna. El uso de  $\text{SO}_2$  optimiza los rendimientos de forma similar al ácido sulfúrico diluido (Tengborg y *col.*, 1998), pero actualmente se suele preferir el uso del ácido diluido por su bajo coste respecto al gas. Se han descrito rendimientos cercanos al 90% para la extracción de hemicelulosas y para la hidrólisis enzimática en el pretratamiento con  $\text{SO}_2$  de madera de abeto (Söderström y *col.*, 2002).

El uso de *dióxido de carbono*,  $\text{CO}_2$ , ofrece los beneficios de la catálisis ácida sin los principales inconvenientes del ácido sulfúrico, ya que la disminución de la presión del reactor produce la liberación de este gas, evitando la inversión económica necesaria para la neutralización del agente reactivo utilizado. El principal efecto de este agente se produce a elevadas temperaturas (~200 °C) disolviéndose en la fase acuosa y dando lugar al ácido carbónico. Cuando el pretratamiento ha finalizado y la temperatura disminuye, el equilibrio del ácido carbónico se desplaza, de nuevo, hacia la generación de  $\text{CO}_2$ , el cual puede volverse a recuperar disminuyendo la presión en el reactor.

El ácido carbónico es relativamente suave y por lo tanto, no ofrece la misma capacidad hidrolítica que el ácido sulfúrico. Sin embargo se ha demostrado que a temperaturas del orden

de 200 °C, el ácido carbónico produce un efecto catalítico sobre la hidrólisis de los xilanos presentes en la materia prima. Van Walsum y Shi (2004), en un estudio sobre la implementación de CO<sub>2</sub> en el PACL de bagazo del maíz, observaron que a 200 °C se incrementa la solubilización de xilanos con bajo grado de polimerización, comparado con el pretratamiento usando sólo agua. Así mismo, se aumentaba la concentración de compuestos furánicos en el hidrolizado. McWilliams y Van Walsum (2002) compararon el pretratamiento con agua caliente sobre madera de álamo, con y sin el uso del ácido carbónico, concluyendo que no había diferencias significativas respecto al uso del CO<sub>2</sub> o no, sobre los rendimientos de recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida. Esto podría deberse al alto nivel de ácidos endógenos producidos por la alta acetilación del sustrato, y sugirieron que el uso del ácido carbónico podría mostrar rendimientos más satisfactorios en materias primas con un menor grado de grupos acetilo.

#### 1.5.3.2 Pretratamientos básicos

Los compuestos básicos utilizados como agentes de reacción en este tipo de pretratamiento suelen ser los hidróxidos de sodio y calcio [NaOH y Ca(OH)<sub>2</sub>].

Los pretratamientos alcalinos utilizan bajas temperaturas y presiones comparados con otras tecnologías de pretratamiento. Estos procesos pueden realizarse a temperatura ambiente, aunque en estos casos los tiempos de residencia serían de días u horas, más que de minutos o segundos, como en otros pretratamientos.

El tratamiento con NaOH diluido produce un efecto de esponjamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones entre la lignina y los carbohidratos y la alteración estructural de la lignina (Sun y Cheng, 2002). La hidrólisis alcalina de la biomasa se lleva a cabo mediante la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los componentes de la materia prima, dando lugar a una rotura de enlaces, principalmente los formados entre las ramificaciones del componente hemicelulósico y la lignina. Por tanto, la efectividad de este pretratamiento vendrá condicionada por el contenido en lignina del material a tratar. Así, por ejemplo, se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja de trigo, con un contenido de lignina del 18% (Carrillo y *col.*, 2005).

El pretratamiento básico sobre la paja de trigo ha sido ampliamente estudiado por Christakopoulos y *col.* (1991), quienes encontraron una correlación lineal entre el rendimiento de etanol obtenido y el grado de delignificación producido tras el pretratamiento alcalino de este material. En las condiciones óptimas de delignificación [4% NaOH (w/v)], se obtuvo un rendimiento máximo de etanol de 0,275 g/g sustrato en bps, que corresponde a un 67,8% del teórico. Los mismos autores, en un estudio sobre la adecuación de un modelo cinético a la etapa

de hidrólisis enzimática de la paja de trigo pretratada mediante NaOH en diferentes condiciones de proceso, mostraron la posibilidad de alcanzar la conversión completa de celulosa, mediante el uso de celulasas procedentes de *Fusarium oxysporum* F3, siempre y cuando el tratamiento básico produzca un residuo cuya celulosa presente un porcentaje de cristalinidad menor del 60%, o tenga menos de un 10% del contenido en lignina (Koullas y *col.*, 1992).

El hidróxido cálcico,  $\text{Ca(OH)}_2$ , tiene la ventaja adicional de ser un reactivo asequible y seguro. Además, éste es recuperable por la formación de un carbonato cálcico insoluble por reacción con dióxido de carbono. El carbonato puede ser retransformado a hidróxido cálcico. La carga típica de hidróxido cálcico que suele utilizarse en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es 0,1 g de  $\text{Ca(OH)}_2$ /g de biomasa. Se requiere un mínimo de 5 g  $\text{H}_2\text{O}$ /g de biomasa. Este pretratamiento puede realizarse en un amplio rango de temperaturas, desde 25 a 130 °C, con tiempos de residencia que van desde semanas (5-12 semanas a 25 °C) a horas (1-3 horas a 130 °C) (Chang y *col.*, 1998). Una ventaja de usar temperaturas por debajo de los 100 °C es que no se requiere un reactor presurizado, permitiendo la posibilidad de simplificar el proceso. Estas condiciones descritas son óptimas para aumentar la digestibilidad enzimática de la celulosa en materiales bajos en lignina, como las herbáceas. Sin embargo, para materiales más ricos en el citado componente, el pretratamiento puede ser acompañado por la adición de una sobrepresión conseguida mediante el uso de un gas como el oxígeno, que además ayuda, gracias a su poder oxidante, a solubilizar parte de la lignina. El pretratamiento básico con  $\text{Ca(OH)}_2$  fue tratado ampliamente en los años ochenta; Lesoing y *col.* (1980) y Verma (1983), obtuvieron sendos porcentajes de HE del 76 y el 74% del teórico (conversión de glucanos), después del tratamiento de la paja de trigo con  $\text{Ca(OH)}_2$  a temperatura ambiente, durante 120 y 72 h., respectivamente. Esta variante de pretratamiento básico fue utilizado por Chang y *col.* (2001) sobre madera de chopo. En unas condiciones de proceso a 150 °C de temperatura durante 6 h., se retiró el 77,5% de la lignina y los rendimientos de hidrólisis enzimática mejoraron desde el 7 %, del chopo sin pretratar, hasta el 77% del teórico que se obtuvo sobre el material pretratado. El hidróxido cálcico también ha sido usado para pretratar la paja de trigo [(85 °C durante 3 horas (Chang y *col.*, 1998)], madera de álamo [(150 °C durante 6 horas con oxígeno, (Chang y *col.*, 2001)] y residuos del maíz [(100 °C durante 13 horas, (Kim y Holtzapple, 2005b)].

Como inconveniente principal, y marcando una diferencia con los procesos en los que intervienen ácidos como agente hidrolítico, el uso de sustancias alcalinas produce, durante el pretratamiento, una serie de sales que se incorporan a la biomasa como consecuencia de las reacciones que intervienen durante el proceso, y que pueden llegar a constituir un impedimento en la posterior etapa de hidrólisis enzimática.

#### 1.5.3.3 Ozonólisis

El pretratamiento con ozono se ha utilizado sobre numerosos materiales lignocelulósicos como paja de trigo, bagazo, pino, algodón y serrín de chopo (Vidal y Molinier, 1988). El ataque del ozono sobre la materia prima se basa en un efecto deslignificador, ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa apenas se ve afectada. Además de la retirada del componente lignina, el tratamiento con ozono tiene una serie de ventajas como que no origina productos tóxicos que afecten a los procesos posteriores y que la reacción se produce a temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, la gran cantidad de ozono empleado hace de este proceso un método caro (Silverstein y *col.*, 2007) y poco aconsejable para su aplicación industrial.

#### 1.5.3.4 Tratamiento con organosolventes.

El tratamiento con organosolventes se basa en el uso de una mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) o básico (hidróxidos). El principal efecto de estos tratamientos sobre el material lignocelulósico radica en una considerable pérdida del componente lignina y en una retirada parcial de las hemicelulosas, mientras que la celulosa apenas se ve alterada, lo que favorece la subsiguiente etapa de hidrólisis enzimática (Szczodrak, 1988). Entre los solventes orgánicos empleados en el proceso se encuentran: metanol, etanol, acetona y etilenglicol (Pan y *col.*, 2007). También pueden emplearse ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y salicílico. Con objeto de reducir costes y de evitar problemas de inhibición en la posterior etapa de fermentación se deben reciclar los solventes.

#### 1.5.3.5 Deslignificación oxidativa

La biodegradación de la lignina puede ser catalizada por una enzima peroxidasa en presencia de  $H_2O_2$ . El pretratamiento del bagazo de la caña con peróxido de hidrógeno aumenta de manera satisfactoria la digestibilidad enzimática de ésta. Según los datos aportados por (Azzam, 1989), alrededor del 50% de la lignina y la mayoría de las hemicelulosas se solubilizan en un pretratamiento con 2% de  $H_2O_2$  a 30 °C en 8 horas, obteniéndose unos rendimientos de hidrólisis enzimática del 95% del teórico a 45 °C en 24h.

#### 1.5.4 Pretratamientos biológicos

Estos pretratamientos consisten en someter a la biomasa lignocelulósica a la acción de microorganismos que tienen la propiedad de generar la maquinaria enzimática capaz de hidrolizar los polímeros constituyentes de la materia prima. Los microorganismos más efectivos en este tipo de tratamientos son los hongos de la podredumbre blanca, blanda y parda, capaces de generar celulasas, hemicelulasas y enzimas degradativas de la lignina, tales como; ligninasas, lignina peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas (Tengerdy y Szakacs, 2003; Cardona y Sánchez, 2007). El principal problema que presenta este tipo de pretratamiento es que estos microorganismos presentan actividad celulolítica, consumiendo la celulosa preferentemente a la lignina. Además, la lentitud a la que se desarrollan estos procesos, constituye otra desventaja adicional. Por ejemplo, (Hatakka, 1983), describe un pretratamiento de paja de trigo con *Pleurotus ostreatus* en el que se convierte el 35% de la biomasa en azúcares reductores en cinco semanas.

En general, bajo requerimiento energético y suaves condiciones ambientales se perfilan como las principales ventajas del pretratamiento biológico. Como inconveniente debe citarse que la tasa de hidrólisis es demasiado lenta.

#### 1.5.5 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento

Tanto en los pretratamientos hidrotérmicos como en aquellos que utilizan agentes hidrolíticos ácidos o básicos, y a causa de las altas temperaturas y tiempos de residencia empleados durante el proceso, se generan una serie de compuestos de degradación que pueden afectar a la hidrólisis enzimática y actuar como inhibidores potenciales del posterior proceso de fermentación.

##### 1.5.5.1 Tipos y procedencia.

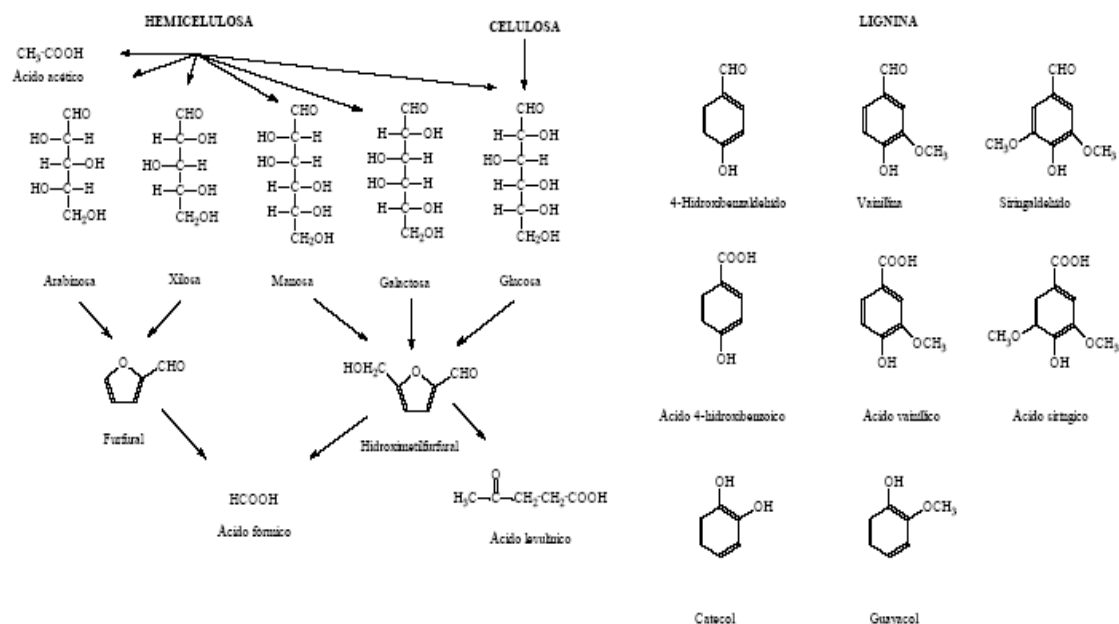
Dependiendo del tipo de materia prima utilizada, tales como maderas duras, blandas o herbáceas, y de las condiciones del pretratamiento, tendremos compuestos inhibidores de una u otra naturaleza. Los productos de degradación pueden dividirse en tres grupos fundamentalmente, atendiendo a su origen: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson y col., 2000). Un esquema de la generación de los mismos se representa en la Figura 25.

*Los derivados del furano* constituyen el primer grupo y podemos encontrar dos principalmente; el furfural, originado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de

las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). La concentración de estos compuestos de degradación dependerá en gran medida de las condiciones utilizadas en el pretratamiento. De este modo, aquellos que utilicen ácidos como agente hidrolítico, y/o desarrollen condiciones a altas temperaturas y/o altos tiempos de reacción, producirán furfural e hidroximetilfurfural, en mayor concentración que aquellos pretratamientos que no lo usen (Wyman, 2007). Los procesos que se desarrollan en condiciones alcalinas no producen aldehídos furánicos ya que éstos no son estables en estos medios, tendiendo a dar reacciones de condensación. Concretamente para la paja de trigo, el derivado del furano que parece encontrarse de manera constante en la mayoría de los pretratamientos sobre este material es el ácido furónico (Klinke y *col.*, 2002).

La formación de *ácidos alifáticos* de bajo peso molecular depende en gran medida de la formación de los derivados furánicos, ya que éstos surgen de su descomposición. El ácido fórmico, procedente de la degradación del 2-furfural (Carrasco, 1991) y el ácido acético, procedente de los restos acetilados de las hemicelulosas y producto final de descomposición de numerosos compuestos (Misrha y Prasad, 1989), son los principales ácidos carboxílicos originados durante el pretratamiento. El HMF origina cantidades equimoleculares de ácidos fórmico y levulínico. También se han identificado una serie de ácidos alifáticos no volátiles producidos en el pretratamiento de la paja de trigo, tales como los ácidos maleico, fumárico, 2,3-dihidroxiopropanoico y 2,4-dihidroxibutírico (Klinke y *col.*, 2002).

Como consecuencia de la degradación de la lignina surge el tercer grupo de compuestos inhibidores, *los derivados fenólicos*, que pueden ser divididos en tres grandes grupos procedentes de la estructura fenólica para y ortodisustituida (ver Figura 25). Los fenoles originados en el pretratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que existen ciertas diferencias en la composición de la lignina atendiendo al grupo taxonómico al que pertenezca la especie vegetal. Los derivados fenólicos más abundantes en los materiales herbáceos suelen ser el 4-hidroxibenzaldehído, acetosiringona, siringaldehído y el ácido sirínico (Klinke y *col.*, 2003). Otros derivados fenólicos serían el ácido vainílico y la vainillina, originados como consecuencia de la degradación de las unidades guayacilpropano. Un derivado fenólico abundante en los hidrolizados procedentes del pretratamiento de las maderas duras es el ácido 4-hidroxibenzoico, el cual se origina por la rotura de los enlaces tipo éster que lo unen a los grupos hidroxilos de los alcoholes cinámicos que forman la lignina (Sjöström, 1981).



**Figura 25. Principales compuestos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.**

Otro tipo de compuestos (no incluidos en los tres grupos citados anteriormente) que se liberan durante el pretratamiento son los extractivos. Entre ellos se encuentran diferentes tipos de resinas (ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras) y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc.). Estos compuestos también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos (Larsson y *col.*, 2000).

Concretamente para la paja de trigo, Klinker y *col.* (2002) proponen la siguiente clasificación de productos originados en la fracción líquida tras el pretratamiento mediante oxidación húmeda. Éstos pueden dividirse en 4 grupos:

- Intermediarios primarios: Serían las hemicelulosas solubles y la lignina.
- Intermediarios secundarios: fenoles y furanos (2-furfural y 5-HMF)
- Intermediarios terciarios: ácidos alifáticos y oligómeros de intermediarios secundarios.
- Productos finales. Dióxido de carbono, agua y ácido acético.

Esta clasificación viene determinada por el orden de aparición de estos compuestos durante la fase de pretratamiento; primero se produce la solubilización de los azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida, a continuación, y dependiendo de la severidad del proceso, se generan los intermediarios secundarios, fenoles y furanos. Los principales compuestos de degradación fenólicos obtenidos como consecuencia del pretratamiento de la paja de trigo mediante oxidación húmeda son: 4-hidroxibenzaldehído, vainillina,

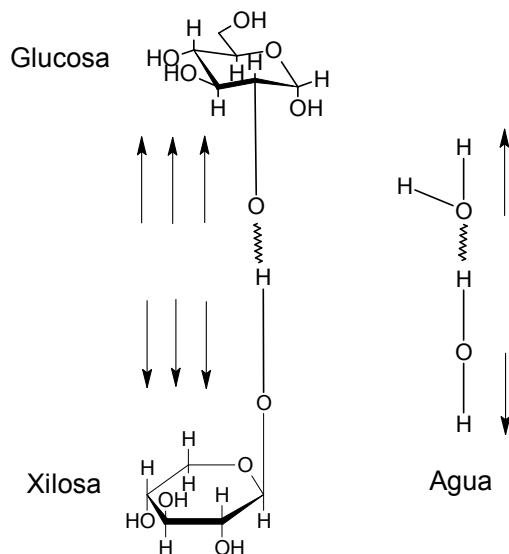


siringilaldehído, acetosiringona, ácido vainílico y ácido sirínico. Además de éstos, existen otra serie de compuestos fenólicos que se encuentran en menor cantidad, pero que también proceden de la degradación de la lignina durante el pretratamiento de la paja de trigo, son: guayacol, alcohol sirínico, 4-hidroxiacetofenona, acetovainillona, acetosiringona, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cumárico y ácido ferúlico. En orden de degradación, estos compuestos dan lugar a la formación de los correspondientes ácidos carboxílicos, los cuales derivan en la formación de CO<sub>2</sub> y agua.

#### **1.5.6 Principales reacciones químicas implicadas en la desestructuración de la biomasa lignocelulósica como consecuencia de la acción de agentes hidrolíticos en el pretratamiento**

Los tres principales tipos de enlace entre los componentes del material lignocelulósico son los enlaces de hidrógeno y los enlaces de tipo éter y éster.

Los *enlaces de hidrógeno* unen las hemicelulosas con la celulosa y están formados entre los hidrógenos de los grupos hidroxilo sustituyentes de ambos compuestos (Bidlack y *col.*, 1992). Estos enlaces son poco energéticos, debido a la baja electronegatividad que posee el átomo de hidrógeno frente a la del oxígeno. El agua es un claro ejemplo de la labilidad de este tipo de enlace. Los puentes de hidrógeno formados entre las moléculas de hemicelulosas y glucosa de biomasa están más polarizados que los del agua, debido a las características de las moléculas que intervienen en el enlace (Figura 26). Además, de los tres tipos de enlace presentes en la materia prima, éste es el más débil, y por lo tanto, más fácilmente rompible conforme la temperatura del pretratamiento va aumentando.



**Figura 26. Esquema de la polarización del puente de hidrógeno entre las celulosas y hemicelulosas de la biomasa lignocelulósica en comparación al agua.**

La cantidad de puentes de hidrógeno que conforman la estructura de las hemicelulosas es menor que en la celulosa. Este factor influye en el grado de resistencia a la hidrólisis de ambos componentes, ya que la accesibilidad del agente hidrolítico encargado de desestructurar la materia prima, está directamente relacionada con el número de puentes de hidrógeno presentes en la estructura a hidrolizar.

Los enlaces tipo éter son los responsables de las uniones entre los monómeros constituyentes de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, así como de las uniones hemicelulosa-lignina. Es importante reseñar que el enlace éter es muy estable ante el ataque de ácidos, excepto HI y HBr, y resulta menos reactivo frente a las bases. Las altas temperaturas empleadas en la mayoría de los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica producen sobre el átomo de oxígeno un aumento de la densidad electrónica negativa que le confiere una mayor susceptibilidad ante el ataque de un electrófilo (Peter y *col.*, 1998).

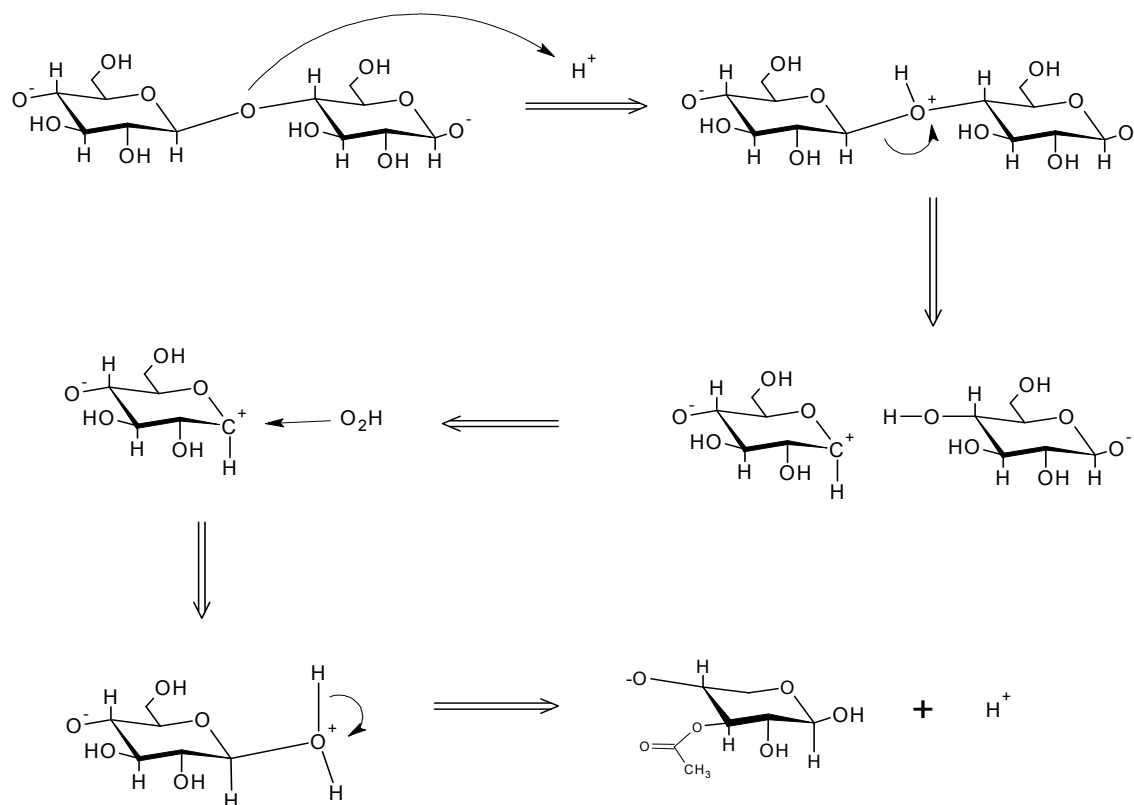
Por último, los de tipo éster unen los grupos acetilos a la cadena del heteropolímero principal de las hemicelulosas, además de encontrarse en las uniones lignina-hemicelulosa.

#### 1.5.6.1 Despolimerización de la celulosa

Debido a la naturaleza del enlace  $\beta(1,4)$  que une los monómeros de glucosa en la celulosa, y cuando el pretratamiento de la biomasa se realiza a altas temperaturas y tiempo de residencia, independientemente del agente hidrolítico que se utilice, se pueden producir roturas de los enlaces glucosídicos más expuestos estéricamente, provocando la despolimerización

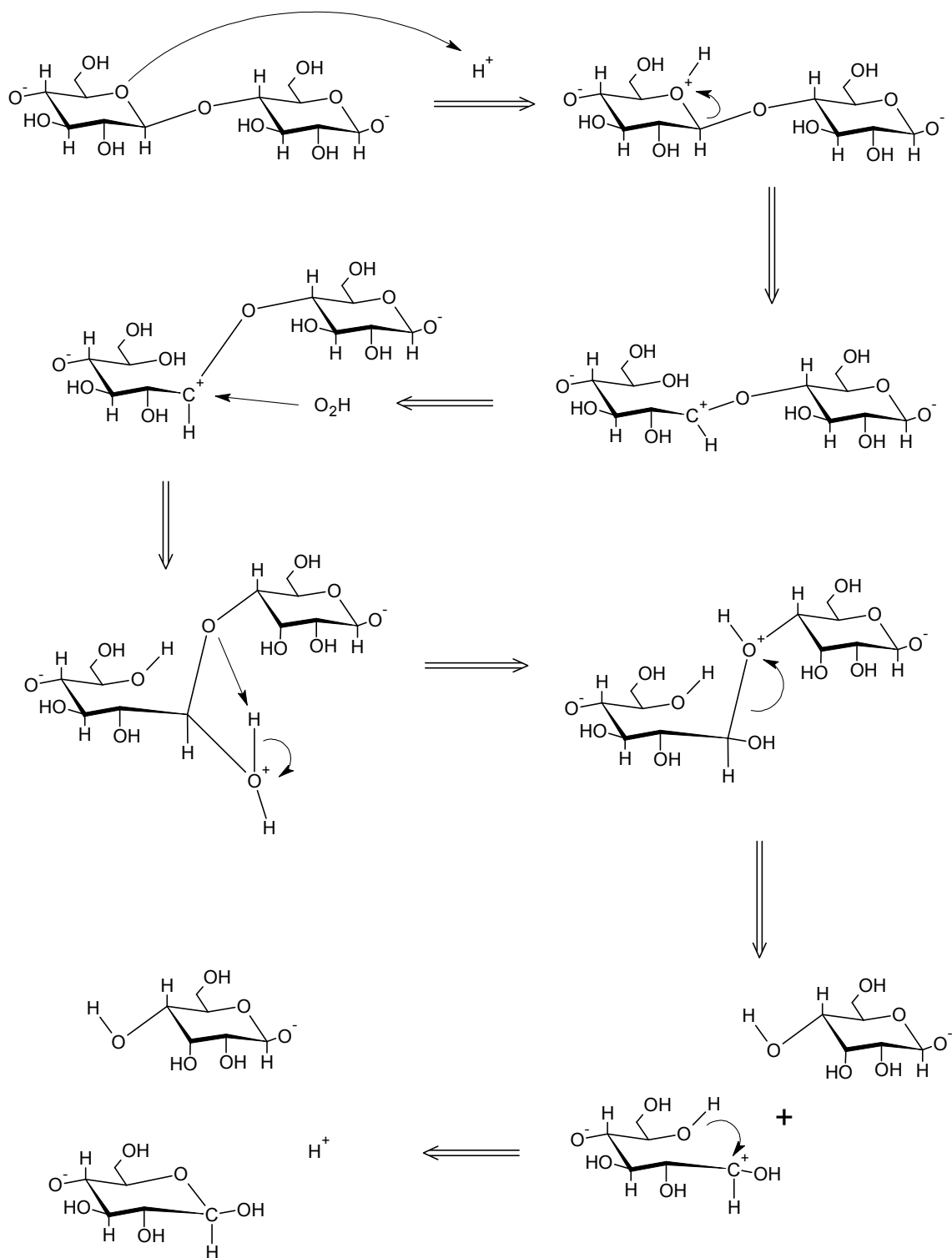
parcial de la celulosa. El mecanismo de reacción para esta escisión depende de si el pretratamiento se realiza en medio ácido o básico.

*En medio ácido* se produce la protonación del oxígeno glucosídico, provocando la formación de un carbocatión terciario el cual se estabiliza por el ataque nucleofílico del agua (Nevell y Zeronian, 1985) (Figura 27).



**Figura 27. Mecanismo de reacción de la hidrólisis ácida de la celulosa.**

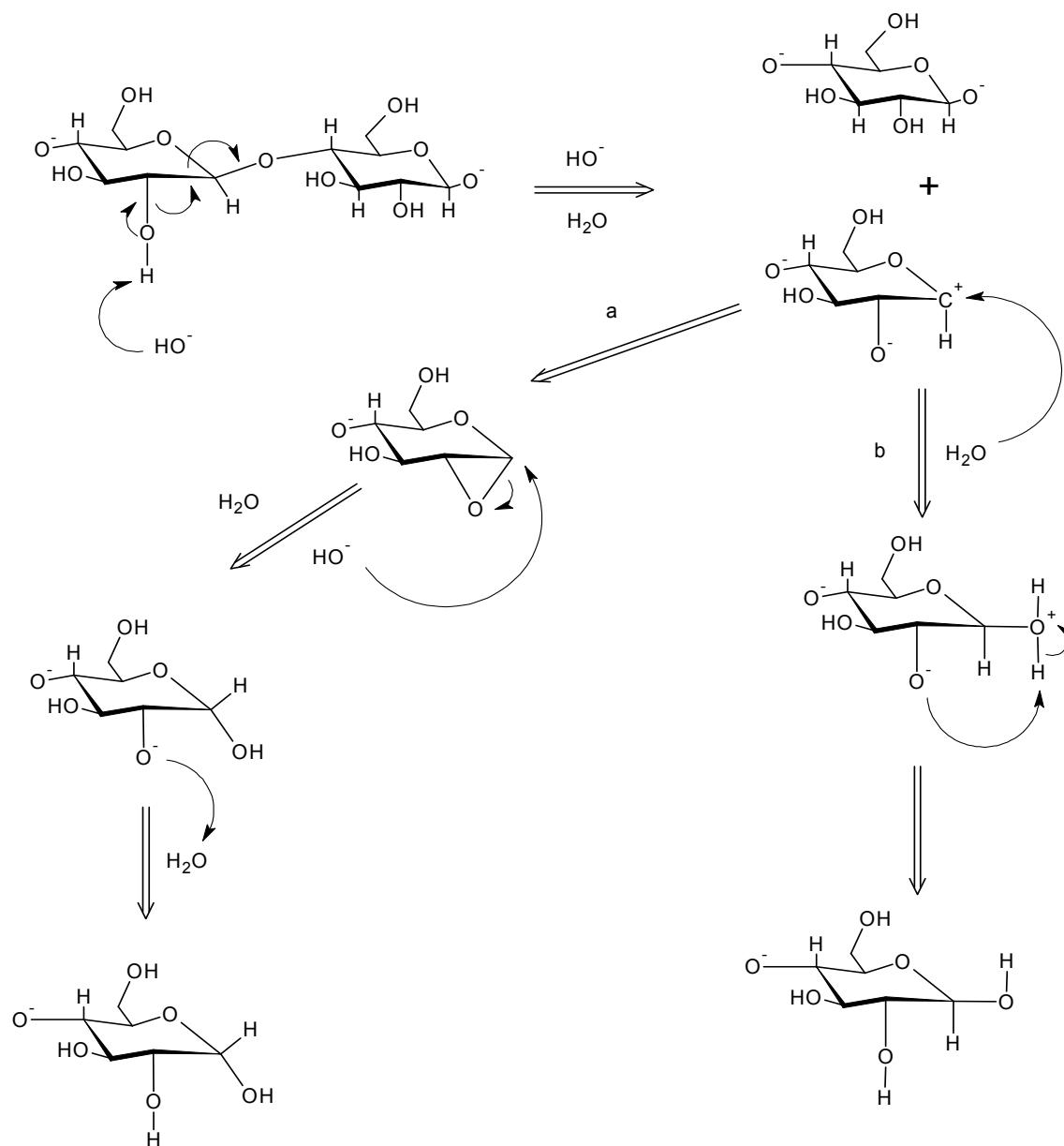
Otra posible vía para la escisión de la celulosa pasa por la protonación del oxígeno del anillo, dando lugar a la apertura de éste, y a la formación de un carbocatión no cíclico (Fengel y Wegener, 1989) (Figura 28).



**Figura 28. Mecanismo de reacción de la hidrólisis ácida de la celulosa.**

Aunque se ha discutido sobre la validez de ambas vías, en la mayoría de los casos se ha descrito un mecanismo dirigido hacia la formación del carbocatión cíclico (Figura 27) debido a la estabilidad que presenta esta configuración molecular.

Cuando la hidrólisis de la celulosa se produce *en medio básico*, se produce la rotura del enlace éter cuando se alcanzan temperaturas superiores a 170 °C (Lai, 1981). El mecanismo de hidrólisis en medio básico no es fácil de elucidar, porque existen numerosas reacciones que se producen paralelamente. El más plausible entre los datos bibliográficos encontrados (Lam y col., 2003) es el ataque nucleofílico del  $\text{OH}^-$  al hidroxilo del carbono 2, con la consiguiente ruptura del enlace glucosídico, Figura 29. Esto origina un carbocatión que puede estabilizarse de múltiples maneras, vía “a” o “b”, debido a la simultaneidad de reacciones paralelas.



**Figura 29. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de la celulosa en medio básico**

## 1.5.6.2 Desestructuración de las hemicelulosas

## 1.5.6.2.1 Formación del Ácido Acético

Los grupos acetilos presentes en la biomasa se encuentran unidos al heteropolímero principal constituyente de los azúcares hemicelulósicos, mediante un enlace éster. Por su naturaleza, los enlaces éster pueden ser hidrolizados tanto por el agua, como por un ácido o por una base. En estas reacciones se produce la reducción del enlace éster con la consiguiente formación del ácido carboxílico y el alcohol correspondiente. Es importante reseñar que, a elevadas temperaturas, se favorece la hidrólisis de los grupos acetilos por el agua, con la consiguiente formación del ácido acético en disolución. Éste, a su vez, cataliza junto al agua la rotura del enlace éster que unen los grupos acetilos y la lignina a las hemicelulosas (Garrote y col., 2002). El mecanismo de formación del ácido acético, en medio ácido, se describe en la Figura 30.

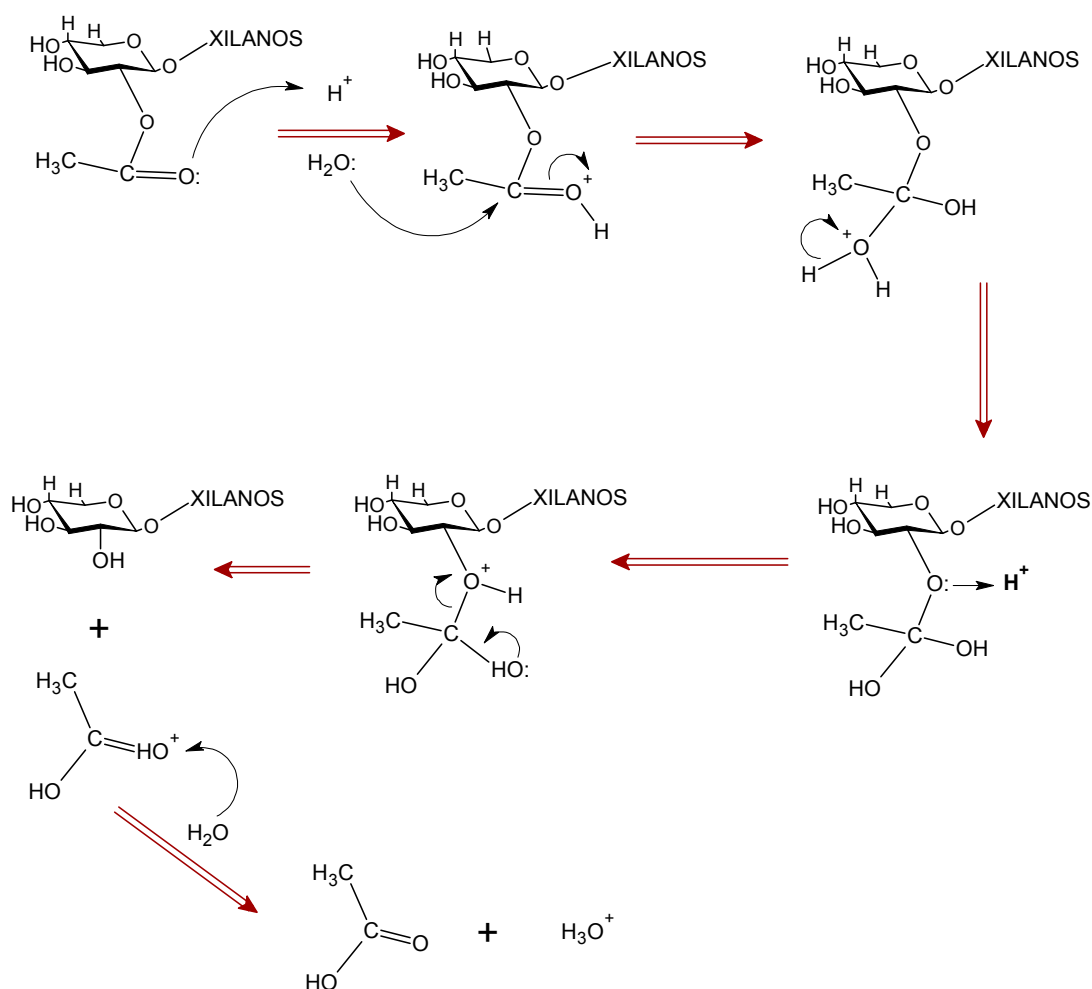


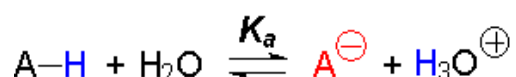
Figura 30. Mecanismo de formación del Ácido Acético.

Como se puede observar, el primer paso es la protonación del oxígeno carboxílico. El segundo paso consiste en una adición nucleófila del agua al carbono carboxílico. A continuación se produce una transferencia de un protón intramolecularmente hacia el oxígeno directamente unido al xilano. Esto provoca la salida del ión carbohidroxilo, el cual se transforma en ácido acético en medio acuoso.

La liberación de estos grupos acetilos se producirá de manera incremental a lo largo de un pretratamiento hidrotérmico, ya que al ir aumentando la acidez en el medio, se va facilitando la protonación del oxígeno carboxílico del grupo acetilo y esto provoca que se incremente la rapidez de la reacción descrita.

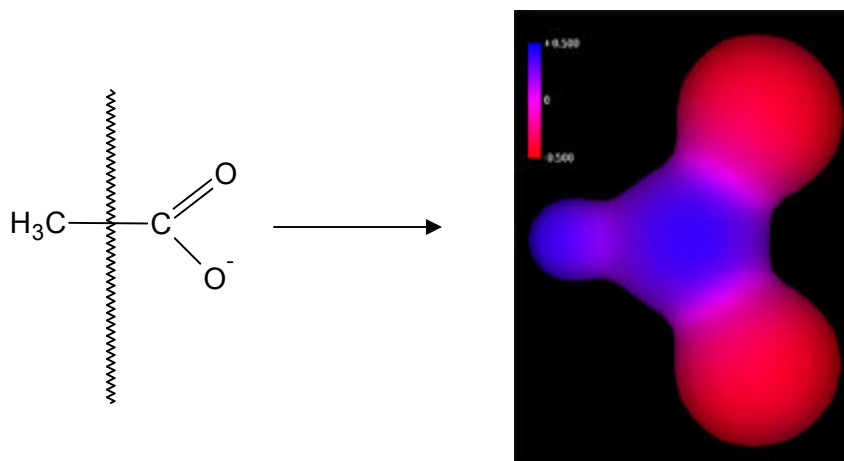
#### 1.5.6.2.2 Reacciones de despolimerización en medio ácido

Como se ha descrito, las reacciones de despolimerización en medio ácido comienzan por la protonación de un oxígeno, el de unión en los éteres, y el del carboxilo en los ésteres. Esta protonación se produce más rápidamente y en mayor medida, cuanto mayor sea la concentración de ácido en el medio. Durante el pretratamiento, la acidez del medio viene fijada por la cantidad y fortaleza de los ácidos presentes. La fortaleza de un ácido está determinada por la estabilidad de su base conjugada (A- en Figura 31). Cuanto mayor capacidad de estabilizar la carga negativa tenga la base conjugada, mayor será la fortaleza del ácido y por tanto mayor capacidad de disociación presentará. Este hecho se refleja directamente en el valor de pKa del ácido, cuanto menor sea su valor, mayor será la disociación del ácido en medio acuoso.



**Figura 31. Equilibrio de disociación simple de un ácido**

Durante el pretratamiento hidrotérmico de la biomasa lignocelulósica en ausencia de agentes hidrolíticos, el ácido mayoritario presente en el medio es el ácido acético, derivado de los grupos O-acetilos presentes en el componente hemicelulósico. Además, existen otros ácidos orgánicos como el fórmico y el levulínico, aunque estos en menor medida. La fortaleza del ácido acético viene definida por la estabilidad de su base conjugada, el ión acetato. La gran capacidad de deslocalización de la carga negativa que presenta el acetato es gracias a la simetría que presenta el ión carboxilato, las distancias C-O son idénticas y la carga negativa está repartida por igual entre ambos oxígenos (Figura 32).



**Figura 32. Deslocalización de la carga negativa en el anión carboxilato.**

Esta capacidad para deslocalizar la carga negativa le confiere al ácido acético un valor de pKa de 4,74. La cantidad de hemicelulosas solubilizadas en la fracción líquida nos da una idea de la capacidad dissociativa que el acético tiene sobre los enlaces éster y éter que unen los componentes de la materia prima.

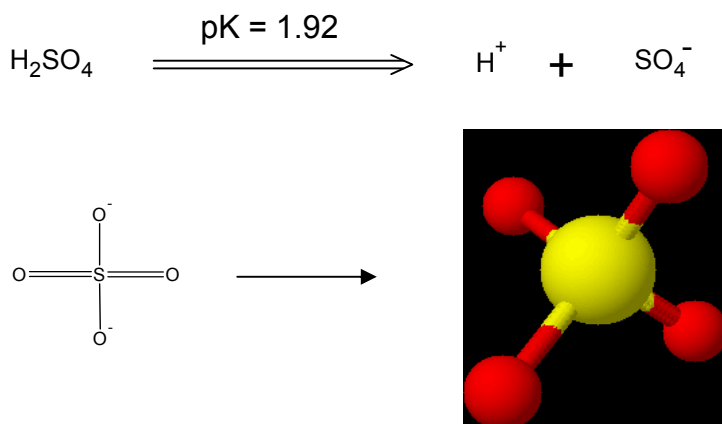
Una de las razones del aumento en la cantidad de hemicelulosas solubilizadas en la fracción líquida cuando se utiliza un agente hidrolítico externo, como el ácido sulfúrico, frente al uso de agua, se debe a un incremento en la disociación de enlaces ésteres y éteres que conforman la uniones de los componentes en la materia prima. La mayoría de los trabajos publicados sobre el pretratamiento ácido de la biomasa lignocelulósica, concluyen que los rendimientos en recuperación de azúcares hemicelulósicos se ven favorecidos al utilizar dicho agente hidrolítico (Mosier y *col.*, 2005).

Esta gran capacidad de rotura, y por tanto, de alteración de la biomasa que muestra el ácido sulfúrico, es debida a la mayor fortaleza como ácido que presenta frente al acético. El valor para la pKa del ácido sulfúrico es de 1,92, frente al 4,74 que presenta el acético. Esto se traduce en una mayor concentración de protones en el medio capaces de protonar al oxígeno correspondiente, ya sea un éster o un éter, y comenzar la escisión de dicho enlace. Si además a esto se le añade los impedimentos estéricos que surgen como consecuencia de la estructura de los componentes dentro de la pared celular (Esteghlalian y *col.*, 1997), cabe pensar que los primeros enlaces en romperse serán los más accesibles, y después los más impedidos estéricamente. Para atacar estos últimos se hace necesaria una concentración de ácido en el medio lo suficientemente alta como para provocar la penetración de los protones en estas zonas menos accesibles.

La mayor fortaleza del ácido sulfúrico deriva de la gran estabilidad que presenta el ión sulfato. La gran simetría que presenta la molécula, y la capacidad para deslocalizar las cargas



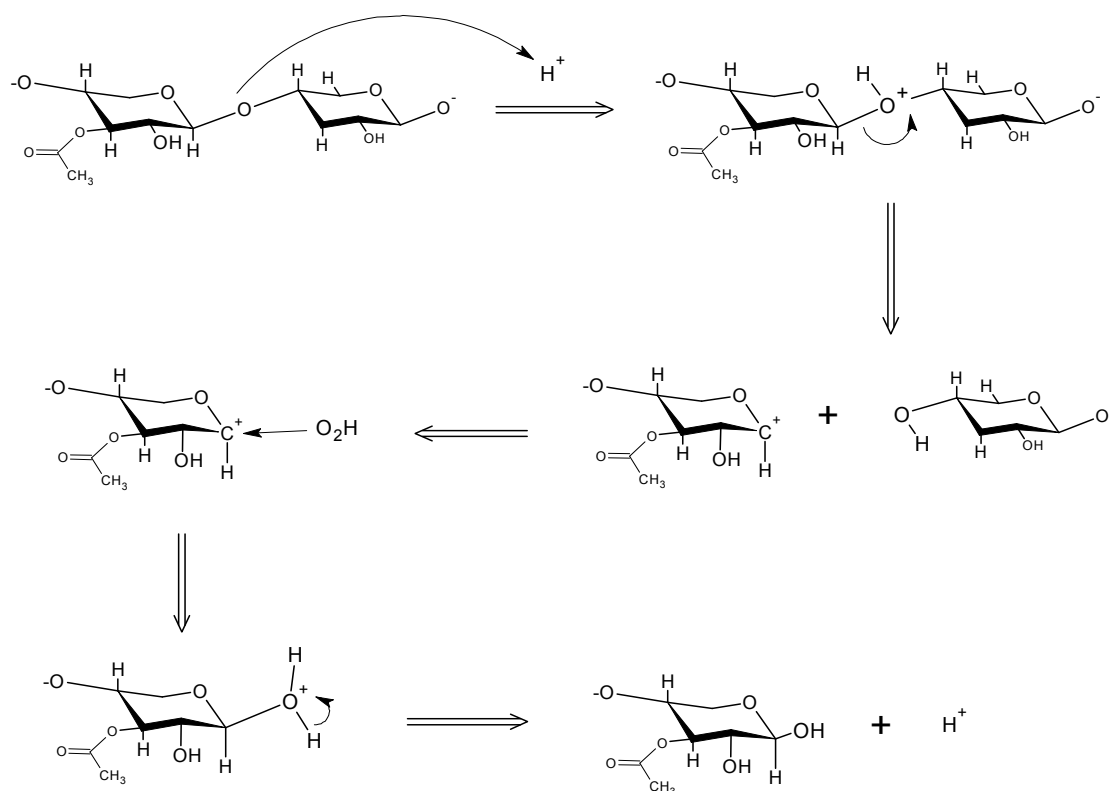
negativas de los oxígenos, (los cuatro oxígenos equidistan del azufre) hacen del sulfúrico uno de los ácidos inorgánicos de mayor fortaleza (Figura 33).



**Figura 33. Disociación del Ácido sulfúrico en agua y estabilidad de la base conjugada.**

Otro de los aspectos que se derivan de la utilización del ácido sulfúrico como agente hidrolítico en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Aguilar y *col.*, 2002; Silva y *col.*, 2005), es que los azúcares encontrados en la fracción líquida originada después del proceso, se encuentran mayoritariamente en forma monomérica. Se ha descrito que durante el tratamiento hidrolítico de la paja de trigo en ausencia de ácido, la mayoría de los azúcares analizados en la fracción líquida se encuentran en forma de oligómeros (Perez y *col.*, 2007), mientras que el uso del ácido sulfúrico proporciona un prehidrolizado mayoritariamente en forma monomérica. En este sentido, Ballesteros y *col.* (2006), en el pretratamiento por explosión a vapor de paja de trigo impregnada con ácido sulfúrico, obtuvieron un prehidrolizado con el 90% de los azúcares en forma monomérica. Estos datos apoyan la idea de una incapacidad de los ácidos orgánicos presentes en el hidrolizado, tras un pretratamiento hidrotérmico sin agentes químicos, de romper todas las uniones glicosídicas que unen los monómeros constituyentes de las hemicelulosas.

Por otra parte, la fortaleza del ácido sulfúrico frente al acético también se ve reflejada en la capacidad para disociar el enlace éter que une los monómeros que conforman el eje principal de la estructura hemicelulósica. A modo de ejemplo, en la Figura 34 se representa el mecanismo de rotura que sigue el enlace glicosídico formado entre las unidades  $\beta$ -D-Xilopiranosas. Este enlace se describe por ser el mayoritario en las biomasas cuyo principal componente hemicelulósico es el polímero de xilano, como en la paja de trigo (Sun y *col.*, 2005b).



**Figura 34. Mecanismo de reacción de la hidrólisis del enlace glicosídico en medio ácido**

Existen teorías muy extendidas y corroboradas científicamente, acerca de la reactividad de los xilanos con el agua, o con ácido. La más extendida considera a la fracción hemicelulósica una matriz amorfa formada por dos tipos de xilanos, teniendo en cuenta que la xilosa es el azúcar mayoritario dentro de las hemicelulosas (Esteghlalian y *col.*, 1997; Ranganathan y *col.*, 1985; Maloney y *col.*, 1985; Aguilar y *col.*, 2002). Según la citada teoría, existe una fracción de xilanos que reacciona rápidamente, y por tanto, se disuelve con mayor facilidad en la fracción líquida, y una fracción difícil de hidrolizar, la cual se encuentra en el término medio entre la solubilización en la fracción líquida y la degradación a compuestos de más bajo peso molecular (compuestos de degradación). La mayoría de estos estudios concluyen que existe aproximadamente un 20% de azúcares hemicelulósicos que se encuentran en dicho término medio.

Existen, al menos, tres respuestas al porqué de esta incapacidad para recuperar la totalidad de estos azúcares (Ranganathan y *col.*, 1985; Fengel y Wegener, 1989). La primera de ellas hace referencia a limitaciones de transporte electrónico dentro de la masa reactiva, que causa concentraciones locales provocando desviaciones en el transcurso de la reacción. La segunda diferencia a las dos porciones de hemicelulosas en función de su reactividad intrínseca, la cual puede cambiar durante la hidrólisis. Finalmente, la tercera duda de la naturaleza homogénea de la reacciones de hidrólisis en el seno de la biomasa lignocelulósica. Aunque las

tres teorías están siendo estudiadas, la segunda es la que más se ha utilizado para correlacionar la variación de los datos experimentales en múltiples tipos de materias primas, entre ellas la paja de trigo (Grohmann y *col.*, 1985).

Como se ha comentado anteriormente, la lignina y las hemicelulosas juegan un papel fundamental en la conformación estructural de la pared secundaria de las células. Existen zonas dentro de la pared celular de la paja de trigo, donde la sustitución de las hemicelulosas por parte de la lignina, y viceversa, se hace de manera indiscriminada, provocando una matriz arraigada de ambos compuestos donde el acceso de los agentes hidrolíticos, y en consecuencia, su acción, da lugar a múltiples vías de reacción, provocando ese punto intermedio entre la formación de los monómeros constituyentes y la degradación de los mismos. A estas partes más impedidas estéricamente hace referencia el 20% de azúcares hemicelulósicos de la materia prima difícil de solubilizar en la fracción líquida.

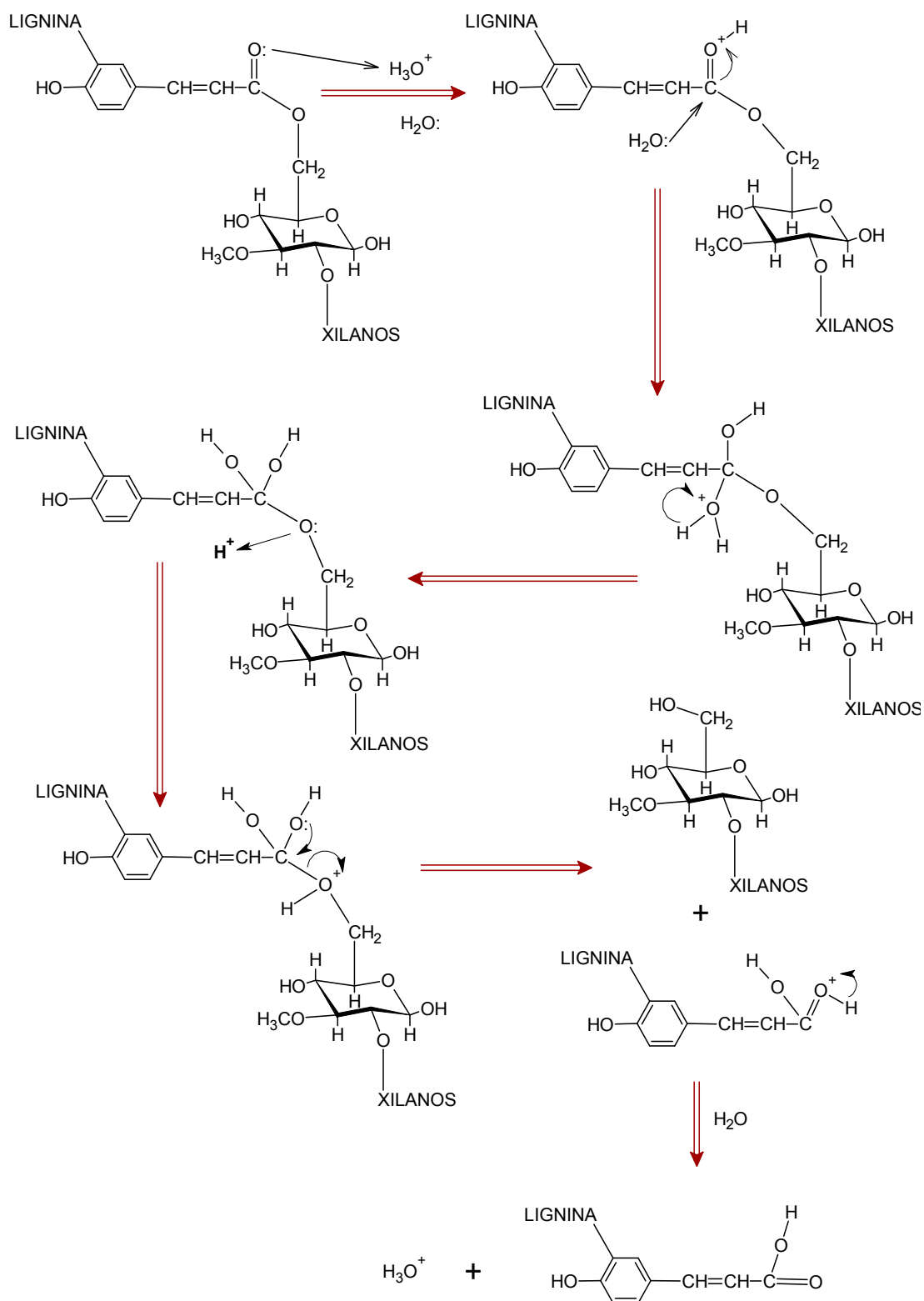
#### 1.5.6.3 Desestructuración del complejo hemicelulosa-lignina

Se ha descrito que el pretratamiento de la biomasa en medio acuoso a altas temperaturas provoca una acidez del medio de reacción como consecuencia de la liberación de ácidos orgánicos. Estos ácidos se encuentran parcialmente disociados generando una concentración de hidrogeniones suficiente para catalizar la rotura de los principales enlaces que unen las hemicelulosas con la lignina.

##### 1.5.6.3.1 Ruptura del enlace tipo éster

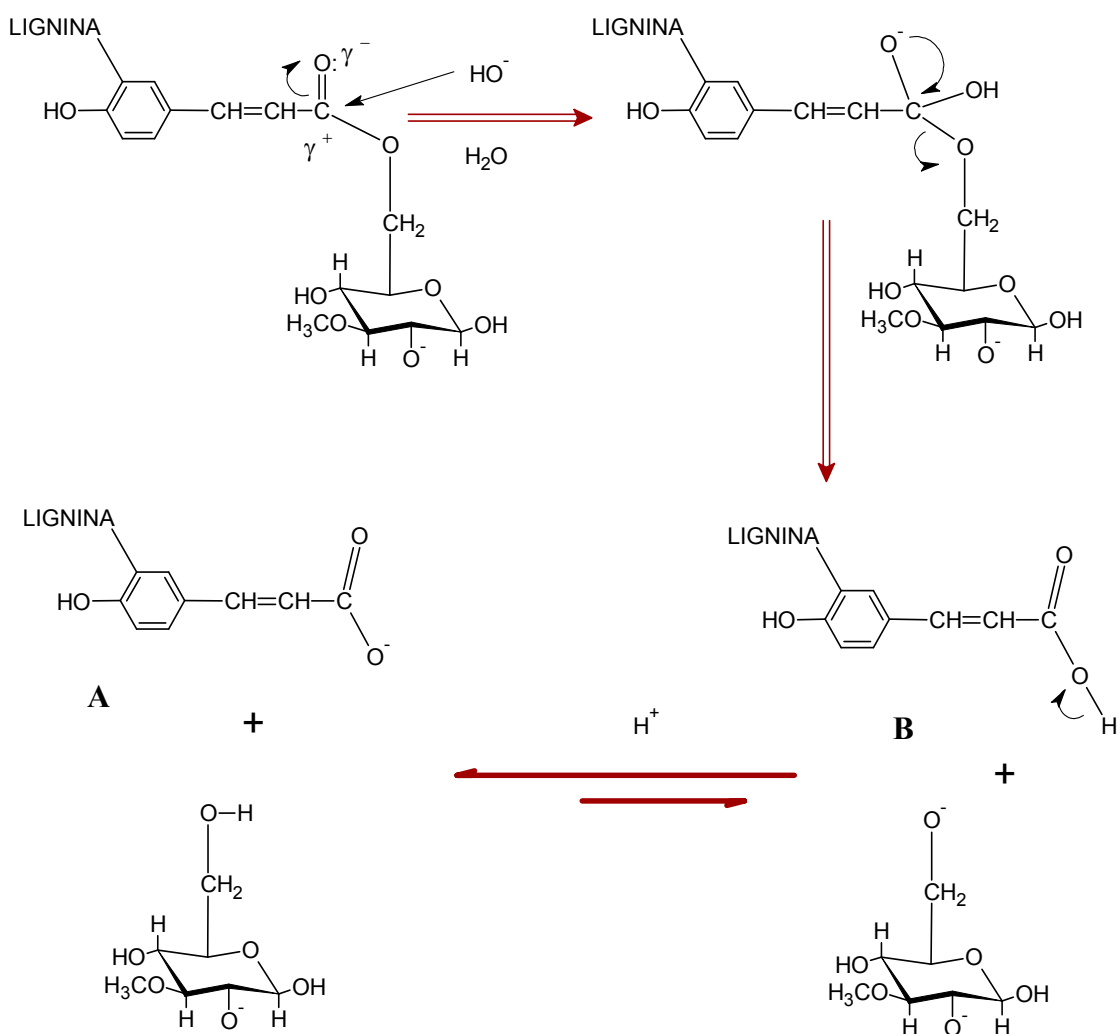
Uno de los enlaces ésteres más relevantes en la estructura de la biomasa, en lo que a la efectividad del pretratamiento se refiere, es el que articula la estructura hemicelulósica con la lignina. Concretamente, en la pared celular de la paja de trigo, parece ser que el mayoritario de los enlaces tipo éster es el que une el ácido 4 – O – metil glucurónico con las unidades de ácidos p-cumárico y ferúlico, (Lawther y *col.*, 1996; Sun y *col.*, 1997; Sun y *col.*, 2002; Faunds y *col.*, 2004).

A modo de ejemplo, en la Figura 35 se describe el mecanismo de disociación de este enlace, en medio ácido. Las etapas de dicho proceso se pueden equiparar a las sufridas por los grupos acetilos durante la formación del ácido acético, pero teniendo en cuenta que la mayoría de los protones que intervienen ahora en la alteración estructural del complejo hemicelulosa-lignina, provienen de la disociación en medio acuoso del ácido acético y demás ácidos orgánicos generados en los primeros momentos del pretratamiento.



**Figura 35. Disociación del enlace éster formado entre las hemicelulosas y lignina durante el pretratamiento de la paja de trigo, en medio ácido**

La disociación del enlace éster también se puede realizar mediante catálisis básica, aunque en este medio de reacción no se podría considerar a la base como un catalizador, sino, más bien, como un reactivo, ya que se irá consumiendo a lo largo del proceso debido a la neutralización parcial producida por los ácidos generados en el medio. Existen numerosos trabajos en la bibliografía sobre el pretratamiento en condiciones básicas de la paja de trigo (Schmidt y Thomsen, 1998; Carrillo y *col.*, 2005). El mecanismo de reacción ocurrido en medio básico, Figura 36, difiere del ácido por la presencia de un nucleófilo mucho más fuerte que el agua, el  $\text{OH}^-$ , lo cual provoca un desplazamiento más rápido del ión arabinoxilano. La capacidad de deslocalización de la carga negativa que presenta el producto **A** frente al **B**, dirige, casi irreversiblemente, el último paso del mecanismo.



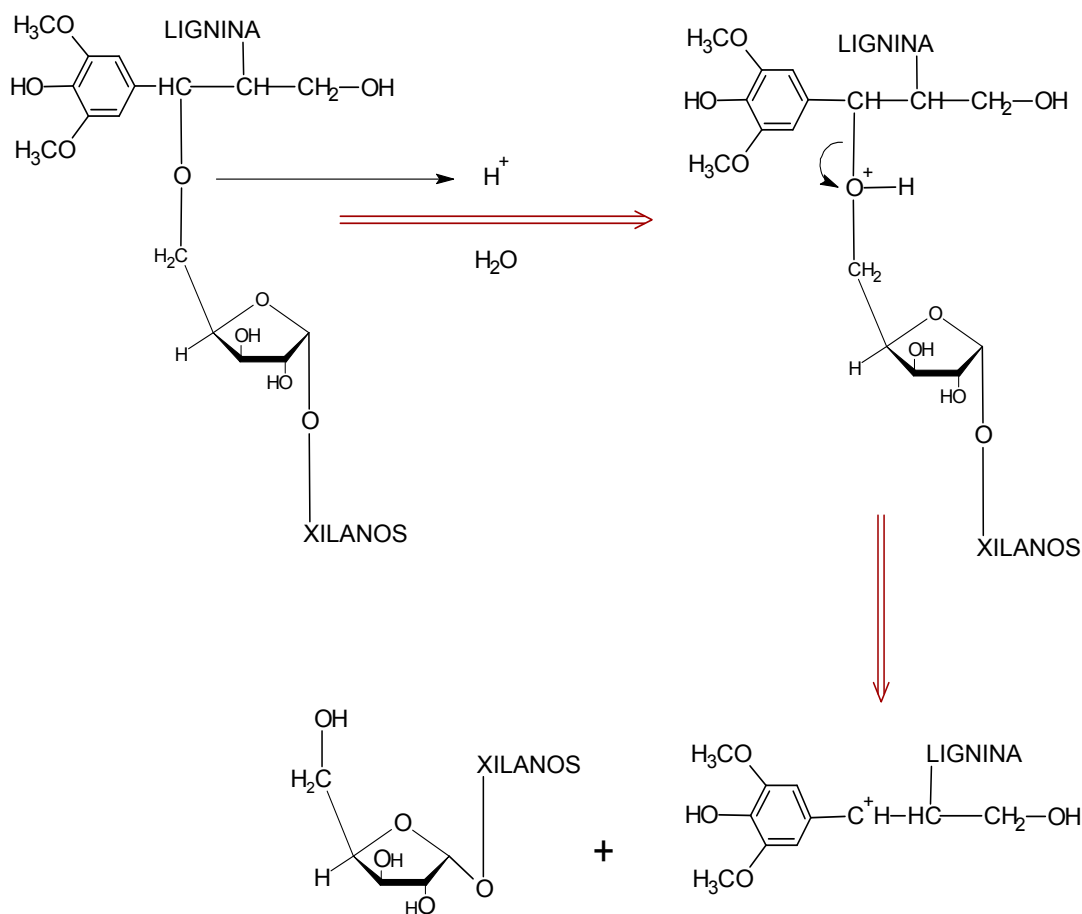
**Figura 36.** Disociación del enlace éster entre las hemicelulosas y lignina durante el pretratamiento de la paja de trigo, en medio básico

## 1.5.6.3.2 Ruptura del enlace tipo éter

Como se ha descrito, la mayoría de enlaces tipo éter en la materia prima se encuentran en la unión de los monómeros que conforman las cadenas principales de los polímeros celulosa y hemicelulosa, y, en menor cantidad, también se encuentran en la unión entre los diferentes componentes que integran la biomasa lignocelulósica.

Un gran número de estudios realizados sobre la composición y el ordenamiento estructural de la pared de las células en la paja de trigo concluyen que la mayoría de los enlaces entre la lignina y las hemicelulosas se realizan mediante un enlace tipo éter entre los arabinoxilanos y las unidades de ácidos ferúlico, diferúlico y p-cumárico (Brett y Waldron, 1996b; Sun y *col.*, 1998; Lam y *col.*, 2001; Carrillo y *col.*, 2005).

El mecanismo propuesto para la hidrólisis, *en medio ácido*, de estos enlaces se describe en la Figura 37.

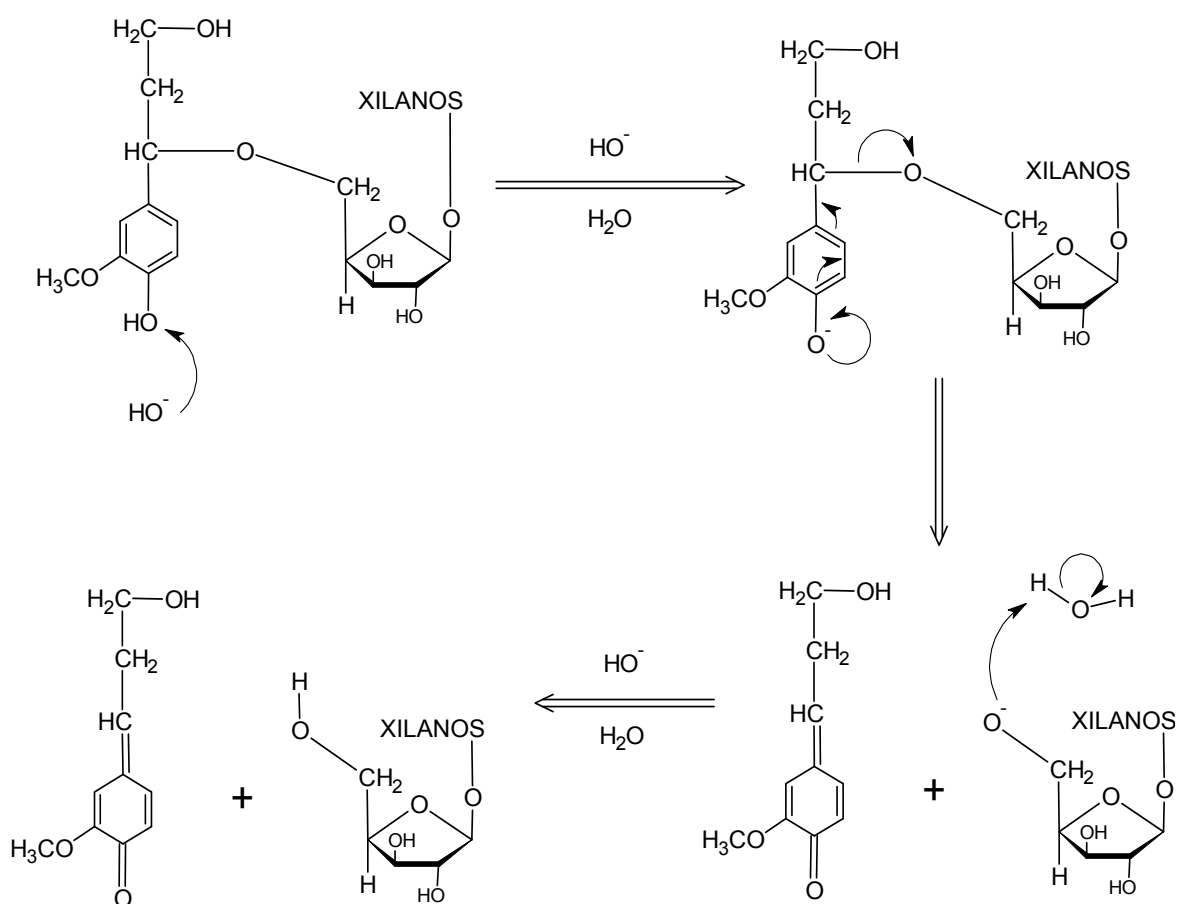


**Figura 37. Mecanismo de disociación del enlace éter entre las hemicelulosas y lignina durante el pretratamiento de la paja de trigo, en medio ácido**

El carbocatión generado en la etapa final del mecanismo es secundario, y está enlazado a un anillo benzílico, lo cual le confiere gran estabilidad gracias a las formas resonantes derivadas (Fengel y Wegener, 1989).

Se ha descrito que en *medio básico* a altas temperaturas (170 °C), se logra romper los enlaces  $\alpha$ -aril-éter, que unen los arabinoxilanos a la lignina (Iiyama y *col.*, 1994; Iiyama y Lam, 2001; Lam y *col.*, 2003; Lam y *col.*, 2003). El mecanismo de hidrólisis es más complejo que en medio ácido, ya que implica una transferencia intramolecular de la carga negativa generada como consecuencia del ataque nucleofílico del  $\text{OH}^-$  (Hagstrom y Sjöstrom, 1982). Esto provoca más de un sitio reactivo y por lo tanto diferentes finales de las reacciones en función del agente hidrolítico básico que estemos utilizando (Sjöstrom, 1981).

Concretamente para la paja de trigo, el mecanismo más aceptado para la rotura del enlace éter, en medio básico, se puede observar en la Figura 38. Podemos ver como el nucleófilo,  $\text{OH}^-$ , ataca al grupo hidroxilo del anillo benzílico. Esto da lugar a un reordenamiento de la carga negativa intramolecularmente, provocando la salida del arabinoxilano.



**Figura 38. Mecanismo de disociación del enlace éter entre las hemicelulosas y lignina durante el pretratamiento de la paja de trigo, en medio básico**

Al término de la reacción, tenemos de nuevo, un intermediario susceptible al ataque nucleofílico, el cual se puede estabilizar de múltiples formas y seguir diferentes vías de reacción (Sjöstrom, 1977).

Es importante notar, que todas las reacciones aquí expuestas representan a la mayoría de las producidas durante la fase de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, ya sea en medio ácido o básico. Lo que realmente tiene lugar es un conjunto de reacciones paralelas dentro del proceso del pretratamiento, que, en algunos casos, conllevan a la formación de otra serie de compuestos, como por ejemplo, los productos de degradación. Debido a la complejidad de representar los mecanismos simultáneos de hidrólisis de los distintos componentes de la pared celular, se ha optado por describir aquellos que tienen una mayor relevancia para la interpretación de los resultados experimentales obtenidos en este trabajo.



## 1.6 DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS

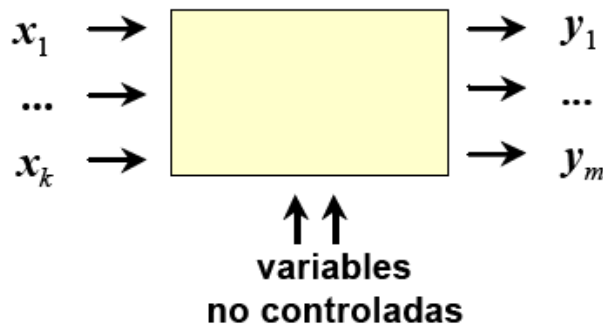
La experimentación debe ser planificada cuidadosamente, para que proporcione la información deseada, teniendo en cuenta el coste de tiempo y recursos (personal, productos de partida, equipamiento...etc) que conlleva la capacidad de investigar. Por tanto, una organización óptima de la experimentación deberá contemplar el menor número de experimentos que permita obtener la información buscada. Ahí es donde la estadística juega un papel relevante, ya que proporciona las herramientas adecuadas para trabajar en los ambientes de incertidumbre por los que vienen afectadas todas las observaciones experimentales (Montgomery, 2004).

En este contexto, tanto por la importancia de las decisiones que se extraen de la investigación como por el elevado coste de la experimentación, no resulta adecuado dejar la elección de las condiciones de experimentación y la evaluación de los resultados a la intuición del experimentador. Lo razonable, en estos casos, es utilizar una metodología matemática que indique, fehacientemente, cómo planificar la secuencia de experimentos a llevar a cabo de una forma óptima, minimizando, en la medida de lo posible, la influencia del error experimental y el coste de la experimentación. Dicha planificación y análisis es llevada a cabo por el Diseño Estadístico de Experimentos (DEE) (Box y *col.*, 1978).

### 1.6.1 Definición

El diseño estadístico de experimentos se puede definir como una metodología de planificación y análisis basada en herramientas estadísticas (Montgomery, 2004). Planificación, porque el DEE selecciona la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo coste, y análisis, porque evalúa los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones obtenidas.

Las situaciones en las que se puede aplicar el DEE son muy numerosas. De forma general, se aplica a sistemas como el mostrado en la Figura 39, en los cuales se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas ( $y$ ) cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes ( $x$ ) controlables llamadas factores. Las respuestas además pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador.



**Figura 39. Representación de un sistema en estudio en DDE: factores (x), respuestas (y)**

Aplicando el DEE a este tipo de sistemas se puede obtener respuesta a las preguntas: ¿en qué valores de los factores se puede centrar la investigación?, de entre todos los factores que afectan al proceso, ¿cuales influyen más?, ¿cómo interaccionan entre ellos?, ¿qué valores de los factores proporcionan las respuestas de mayor calidad?, ¿cómo afectan a la respuesta variaciones no controladas en el valor de los factores?

Su aplicación es tan amplia que abarca desde el laboratorio hasta el proceso de producción. Al facilitar el desarrollo más rápido de productos, y a más bajo coste, el DEE juega un papel fundamental desde el punto de vista industrial y proporciona una ventaja importante para el investigador.

### 1.6.2 Método tradicional vs. Diseño Estadístico de Experimentos

El método tradicional de experimentación, que surge de forma intuitiva para estudiar el sistema de la Figura 39, consiste en ir variando factores (tiempo, temperatura, concentración inicial de sólidos...etc), es decir, a partir de unas condiciones iniciales, se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación del factor, y, por tanto, revela el efecto de ese factor. El procedimiento se repite para los demás factores. Esta forma de actuar contiene un error fundamental: si se variaran dos o más factores entre dos experimentos consecutivos, no sería posible conocer si el cambio en la respuesta ha sido debido al cambio de un factor, al de otro, o al de todos a la vez (Box y col., 1978), en definitiva, no sería posible apreciar si existe interacción entre los factores estudiados.

Por lo tanto, esta estrategia experimental presenta una serie de inconvenientes importantes cuando existe interacción entre los factores. Existe interacción entre dos factores A y B cuando el efecto del factor A es diferente según qué valor tome el factor B, y viceversa. Esta situación se presenta muy a menudo en química, física, biología, etc... Cuando existen tales

interacciones, la metodología tradicional no informa sobre como un factor interactúa con los otros factores o cómo estas interacciones afectan a la respuesta, por lo que sólo se obtiene una comprensión limitada de los efectos de los factores. Sobre la determinación de valores óptimos de las variables respuesta en la metodología tradicional, el experimentador observa que se ha llegado a este valor porque mediante la variación de un solo factor la respuesta no mejora, sin percibir que se puede encontrar lejos del valor buscado. Aunque se puede reiniciar la experimentación partiendo del “óptimo” encontrado, esta solución es extremadamente ineficiente cuando se deben estudiar muchos factores con un elevado número de niveles, lo cual requeriría demasiados experimentos y demasiado tiempo (Romero y *col.*, 1995; Ludlow y *col.*, 1995).

De manera general, los inconvenientes del método tradicional provienen de variar un factor manteniendo constantes los demás. Por tanto, la solución radica en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento. Ello permite mejorar la eficiencia del esfuerzo del experimentador, y obtener información sobre las interacciones. La dificultad estriba en diseñar una experimentación reducida, donde estos cambios simultáneos se complementen entre sí y permitan obtener la información buscada al combinar los resultados de todos los experimentos. El diseño estadístico de experimentos proporciona el marco matemático adecuado donde los niveles de los factores que afectan al proceso son combinados simultáneamente, con el objetivo de obtener información eficiente con un número reducido de experimentos.

### **1.6.3 Metodología del DEE**

A la hora de plantear una investigación mediante esta metodología se deben de considerar los siguientes aspectos (Ludlow y *col.*, 1995):

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo
2. Identificar los factores que potencialmente podrían influir en la función objetivo, y los valores que éstos pueden tomar
3. Elección del diseño experimental
4. Efectuar los experimentos con los valores de los factores decididos en el punto 3 para obtener los valores de las respuestas a estudiar
5. Responder a las preguntas planteadas, en base al conocimiento científico del proceso adquirido, así como utilizando un modelo matemático. Si es necesario, volver al punto 1.

### *1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo*

Cuanto más claramente se plantea el problema y se identifica el propósito o información que se desea conseguir con los experimentos, mayor puede ser la ayuda del DEE. Para obtener una comprensión del proceso es necesario recopilar toda la información disponible sobre el sistema en estudio que pueda ser relevante para la experimentación que se va a realizar. A continuación se debe definir qué respuesta experimental se va a estudiar. Según el objetivo perseguido, puede ser necesario observar más de una respuesta y encontrar un compromiso entre ellas (Montgomery, 2004).

### *2. Identificar los factores que potencialmente podrían influir en la función objetivo, y los valores que éstos pueden tomar*

Identificar y listar todos los factores (variables independientes) que puedan tener influencia en el proceso y, por tanto, en la respuesta, es una de las etapas más relevantes dentro de esta metodología. Se debe considerar si cada factor especificado se mantendrá constante, se variará controladamente, si es incontrolable pero se pueden conocer sus valores o si es incontrolable e imposible de medir.

El experimentador debe ser consciente de la influencia potencial que podría tener cada factor en la respuesta. Los factores no controlados pueden introducir variaciones en la respuesta que dificultan el análisis de los resultados experimentales. Para cada factor se debe definir el intervalo de valores que puede tomar (niveles). La combinación de los niveles de todos los factores configura el rango experimental, el cual contiene los experimentos que, en principio, se podrían realizar (Lee y Gilmore, 2006).

Es importante resaltar, que la elección de los factores y de sus niveles no suele ser fácil. Es el experimentador quien decide donde es interesante estudiar dichos factores. Esta decisión requiere un conocimiento previo del sistema, obtenido de referencias bibliográficas, experiencia previa en el laboratorio, etc.

### *3. Elección del diseño experimental*

Dentro de la metodología del diseño de experimentos, resulta frecuente realizar la experimentación en diversas etapas. En cada etapa, las series de experimentos se agrupan en diseños denominados matrices de experimentos. La selección de una matriz u otra depende del objetivo de cada etapa. En función del objetivo planteado en la investigación se identifican

distintos tipos de diseños que se pueden aplicar a cada caso. Entre los distintos tipos de diseños podemos encontrar (Montgomery, 2004):

a) Cribado

Al plantear por primera vez una experimentación lo más normal es encontrar una larga lista de factores potencialmente influyentes. Debido a que el número de experimentos que suele requerir un estudio u optimización de un sistema aumenta exponencialmente con el número de factores estudiados, es necesario reducir la lista de factores a un número manejable. Los factores no se deberían conservar o eliminar utilizando razones subjetivas como por ejemplo, escoger aquellos para los cuales se dispone del material adecuado en el laboratorio, o aquellos que son más fáciles de controlar. Se deben cribar en función de la significación estadística que presentan sobre la variable respuesta a estudiar. Para determinar dicha influencia, se puede realizar una investigación preliminar mediante un diseño experimental sencillo, que permita determinar lo más rápidamente posible (es decir, utilizando el menor número de experimentos) qué factores tienen más influencia en la respuesta y deben ser estudiados en detalle (los factores clave) y cuales pueden no considerarse porque sus efectos son insignificantes.

b) Influencia de los Factores

Una vez se han identificado los factores más importantes, el siguiente paso consiste en realizar un estudio cuantitativo de sus efectos, y las posibles interacciones, sobre la variable respuesta. Para este propósito se plantean los diseños factoriales completos a dos niveles,  $2^k$ , y los factoriales fraccionados,  $2^{k-r}$ , entre otros. Estos últimos contemplan un menor número de experimentos que los factoriales completos a costa de no ofrecer información que a priori se considera irrelevante (Krafft y Schaefer, 1992).

c) Optimización

El último objetivo de la investigación suele ser la optimización de una o varias respuestas de un proceso, es decir, conocer qué niveles de los factores proporcionan un valor máximo o mínimo de una o varias respuestas simultáneamente. Estos valores óptimos se pueden conocer mediante el uso de determinados modelos estadísticos diseñados para este fin, ya que directamente relacionan, mediante técnicas estadísticas avanzadas, los factores más relevantes con las variables respuesta a estudiar. Los diseños de optimización más comúnmente utilizados

suelen ser; el diseño de composición central o el diseño de optimización Box-Behnken (Montgomery, 2004).

#### *4. Experimentación*

El diseño experimental escogido suele estar descrito mediante variables codificadas. Éstas se particularizan para los factores en estudio, se comprueba si los experimentos son posibles y, si es así, se realiza la experimentación en orden aleatorio respecto al orden en el cual están listados. La ejecución en orden aleatorio es necesaria para asegurar que los factores no contemplados introduzcan confusión y sesgo en los resultados. Se miden las respuestas que son objeto de estudio de la investigación, y los datos experimentales obtenidos se introducen en el modelo diseñado.

#### *5. Interpretación de los resultados*

Una vez se dispone de los resultados experimentales se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Los tests estadísticos permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental. Si se construye un modelo de optimización, se pueden calcular los coeficientes de la función que relaciona factores y variables por el método de los mínimos cuadrados. Así mismo, se puede evaluar el modelo mediante el test ANOVA, y, si los parámetros de regresión se encuentran dentro del rango adecuado, el modelo matemático se puede utilizar para buscar la zona óptima de la variable o variables respuesta.

Es importante resaltar que la realización de todas estas etapas es una metodología cíclica. La información obtenida al realizar una serie de experimentos se debe interpretar para planificar la experimentación posterior. En este momento se comprende mejor el problema y se pueden redefinir o concretar más los objetivos, se pueden descartar factores que se hayan determinado como no relevantes (estadísticamente no significativos), o modificar el valor de sus niveles. Una vez realizadas estas consideraciones se planea una nueva experimentación, y así sucesivamente, hasta encontrar las conclusiones definitivas.

La investigación llevada a cabo en este trabajo sobre el pretratamiento con agua caliente líquida de la paja de trigo para su posterior bioconversión a etanol combustible, ha estado dirigida, en cada momento, por la metodología del diseño estadístico de experimentos, y los pasos que se han establecido para llegar a las conclusiones obtenidas comprenden los aspectos antes descritos.

---

## **2. OBJETO e INTERÉS del TEMA**





Este trabajo está enmarcado en el campo de la investigación para la producción de combustibles líquidos a partir de biomasa (biocombustibles), que surge como alternativa a la utilización de combustibles de origen fósil en el sector transporte. Aunque en los últimos años se han conseguido avances significativos en el desarrollo de tecnologías de producción de biocombustibles líquidos, el elevado coste de las materias primas que se utilizan actualmente para su producción, ligadas al mercado alimentario, hace que no sean competitivos. En este contexto, la utilización de materias primas lignocelulósicas, como por ejemplo la paja del cereal, se vislumbra como una de las opciones más prometedoras para la obtención de bioetanol combustible a bajo coste.

La principal dificultad del uso de biomasa lignocelulósicas, como la paja de trigo, para la producción de etanol vía enzimática, radica en las características estructurales de este tipo de material. La disposición inicial en que se encuentran los distintos componentes que integran esta biomasa hace necesaria una etapa previa de pretratamiento que facilite el acceso de las enzimas requeridas para liberar los azúcares que en la etapa de fermentación serán transformados a etanol.

Según muestra la literatura, sobre la paja de trigo se han ensayado varios pretratamientos, tales como la explosión por vapor, hidrólisis ácida u oxidación húmeda. Los pretratamientos físico-químicos, como la explosión por vapor, han sido, hasta el momento, los que más altos rendimientos han ofrecido para los fines propuestos (Ballesteros y *col.*, 2006). Sin embargo, se ha encontrado que se produce una cierta degradación de la fracción hemicelulósica. En este sentido, el pretratamiento con agua caliente líquida en fase líquida, se ha descrito como un tratamiento más equilibrado en cuanto a la recuperación total de los carbohidratos solubilizables en la fracción líquida. Si bien este pretratamiento ha sido ensayado en diferentes materiales herbáceos (Sreenath y *col.*, 1999; Allen y *col.*, 2001; Laser y *col.*, 2002; Van Walsum y Shi, 2004), existe poca bibliografía acerca de su utilización en la paja de trigo.

En función de las distintas condiciones de pretratamiento elegidas se obtiene un material pretratado cuyas características físico-químicas determinará los rendimientos de las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación, y por tanto, el rendimiento de producción de etanol. Por ello, establecer las condiciones de pretratamiento óptimas resulta un paso imprescindible antes del diseño, a nivel industrial, de un proceso que maximice la producción de etanol vía enzimática sobre un recurso lignocelulósico como la paja de trigo.

En base a estas consideraciones, el objetivo principal de la presente investigación es la optimización del pretratamiento de la paja de trigo, mediante un proceso hidrotérmico con agua caliente en fase líquida, con el fin de obtener un residuo pretratado con elevada susceptibilidad al ataque enzimático, a la vez que una alta recuperación de azúcares derivados de la hemicelulosa en la fracción líquida generada en el pretratamiento. Todo ello, con el objetivo final de incrementar los rendimientos de producción de etanol, contribuyendo así a desarrollar procesos más eficaces y

por lo tanto económicamente más viables, que facilitarán el desarrollo a mayor escala de la producción de bioetanol a partir de sustratos lignocelulósicos para su utilización en el sector del transporte.

Para la consecución de este objetivo general, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Efecto de las variables del proceso de pretratamiento con agua caliente en fase líquida, temperatura, tiempo de residencia, carga de sustrato y aplicación de sobrepresión en el reactor, en la paja de trigo.
- Maximización de la recuperación global de azúcares fermentables a etanol a partir de paja de trigo pretratada mediante pretratamiento con agua caliente en fase líquida, en una etapa de pretratamiento.
- Maximización de la recuperación global de azúcares fermentables a etanol a partir de paja de trigo pretratada mediante pretratamiento con agua caliente en fase líquida, en dos etapas de pretratamiento.
- Evaluación del potencial de producción de etanol de la paja de trigo pretratada en las condiciones de proceso óptimas, mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas.

### **3. MATERIALES y MÉTODOS**



### 3.1 MATERIA PRIMA

El material lignocelulósico utilizado en este trabajo fue paja de trigo, suministrada por Biocarburos de Castilla la Mancha, S.A., con un contenido de humedad variable entre el 6 y el 7%. La biomasa fue triturada hasta un tamaño de partícula máximo de 1 mm, utilizando un molino de partículas tipo Restsch (GmbH, Hann, Alemania), y almacenada hasta su uso.

### 3.2 PRETRATAMIENTO MEDIANTE AGUA CALIENTE EN FASE LÍQUIDA (PACL)

El pretratamiento de la materia prima mediante agua caliente en fase líquida (en adelante agua caliente líquida), fue realizado a escala de laboratorio, en un autoclave presurizado y agitado (modelo EZE-Seal; Autoclave Engineers, Erie, PA, EEUU) (Figura 40). Este reactor de acero inoxidable, Hastelloy-C, tiene un volumen total de 500 ml, posee una manta calefactora (1), una agitación motorizada (2), termopares (3) para controlar la temperatura, tanto de la manta calefactora como en el interior del reactor y una entrada adicional con una válvula (4) para controlar la sobrepresión añadida en el reactor. El módulo experimental dispone de una entrada adicional para algún tipo de gas, permitiendo esto mantener una determinada sobrepresión en el interior del reactor. En este trabajo, el gas utilizado para conseguir esta sobrepresión fue nitrógeno. La agitación y la temperatura de la pared y del interior del reactor son controladas por un controlador digital de la serie TTM-120, fabricado por TOHO Suita Electronics Inc. (Japón).

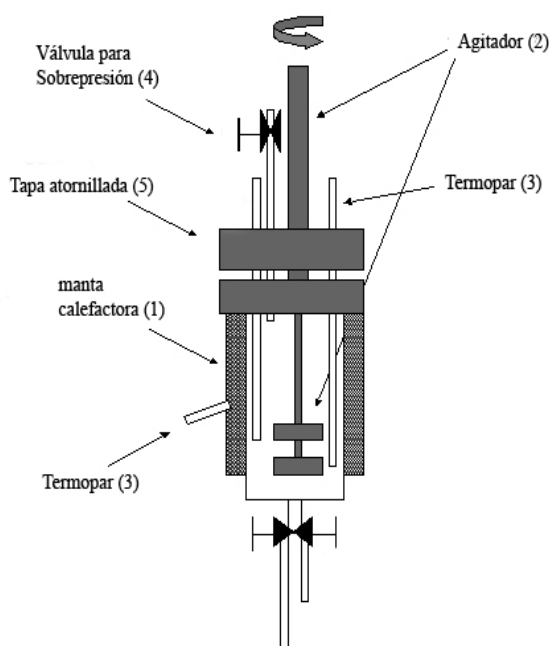
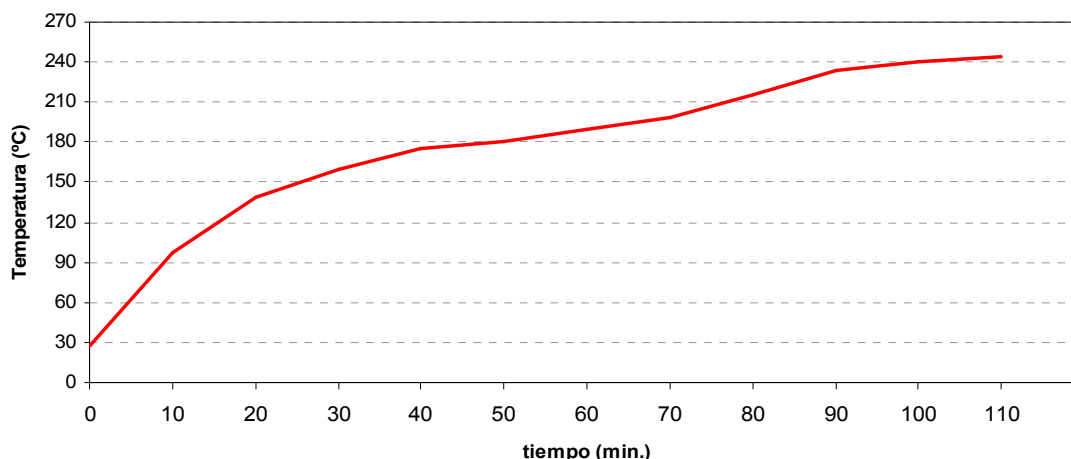


Figura 40. Reactor de agua caliente líquida.

La materia prima y el agua se introducen en el reactor en base a la relación sólido-líquido a utilizar. A continuación, se cierra el dispositivo mediante la ayuda de la tapa atornillada (5), se cubre el reactor con la manta calefactora, se activa la agitación (600 r.p.m.) y se calienta a la temperatura deseada. La velocidad de calentamiento del dispositivo varía entre 2 y 4 °C/min, conforme al gráfico de la Figura 41, donde se representa la curva de calentamiento en el interior del reactor experimental usado.



**Figura 41. Evolución del calentamiento en el dispositivo experimental utilizado.**

Una vez se han alcanzado las condiciones de pretratamiento establecidas, se procede a apagar la manta calefactora y a retirarla del dispositivo. El enfriamiento del reactor se realiza mediante la ayuda de un vaso de precipitados de teflón, lleno de agua fría, con el cual se cubre la mayor parte de la superficie externa del mismo. En ningún caso el tiempo de enfriamiento supera los 6 min. En el momento en el que la presión y la temperatura en el interior del reactor han descendido lo suficiente (0 bares y 30 °C, aproximadamente) se procede a abrir la tapa atornillada. El reactor se vuelca sobre un dispositivo de filtración a vacío mediante el cual se separa su contenido en dos fracciones, un residuo sólido insoluble (RSI) y una fracción líquida (FL).

Los RSI y FL generados en los distintos ensayos de pretratamiento realizados en este trabajo se caracterizaron según se describe en los apartados 3.5.1 y 3.5.2, respectivamente. El RSI se deja secar en estufa de 45 °C, para la posterior realización de las pruebas de hidrólisis enzimática y de sacarificación y fermentación simultáneas.

Para el caso concreto en el que se trabaja con el residuo pretratado completo (RP) no se realiza el paso de filtración, pasando a congelar dicho residuo para su tratamiento posterior.

### 3.2.1 Condiciones de pretratamiento en las distintas fases de la investigación

#### 3.2.1.1 Estudio del efecto de las variables de proceso en el pretratamiento (*Diseño I*)

Esta etapa del trabajo se centró en el estudio del efecto que las variables de proceso tienen en el pretratamiento por agua caliente líquida de la paja de trigo. Las variables consideradas fueron la temperatura, el tiempo de residencia, la relación sólido-líquido y la sobrepresión añadida en el reactor. A efectos del diseño de experimentos, estas variables de proceso se denominan **factores** y la medida del resultado del pretratamiento, **variable respuesta**. Para el factor temperatura, se realizó un estudio preliminar en el intervalo 160-240 °C. A partir de este estudio, se decidió seleccionar como rango experimental de trabajo para los ensayos posteriores 170-200 °C, considerando que en este intervalo se podían apreciar cambios significativos en las respuestas seleccionadas. Para el tiempo de residencia se siguió el mismo criterio, y tras un estudio preliminar entre 1 y 90 minutos, se establecieron los valores de los niveles en 0 y 40 minutos. Debido al sistema de calentamiento del reactor utilizado (el cual puede llegar a tardar unos 45 min en calentarse) se decidió establecer el valor 0 min para referirse a aquellas condiciones experimentales donde la biomasa lignocelulósica no permanece en el reactor más tiempo del empleado hasta alcanzar la temperatura deseada. La carga de sustrato utilizada durante esta etapa de la experimentación fue de 5 y 10% (p/v). El límite superior de carga se estableció en 10% ya que cargas superiores al 10% producían problemas de homogeneización en el reactor. No se utilizaron valores más bajos del 5% ya que en un principio, lo más interesante es introducir la mayor carga de sustrato posible, con el objetivo de hacer el proceso más viable económicamente. La sobrepresión añadida en el reactor tiene como objetivo desplazar el equilibrio de vapor originado durante el proceso, hacia la fase líquida, facilitando las consecuentes reacciones de hidrólisis en la materia prima (Liu y Wyman, 2005). En este sentido, se fijaron los valores de los niveles para este factor en 0 bares, donde no se introducía ninguna sobrepresión en el reactor, y 30 bares, suficiente para alcanzar el objetivo deseado (Mok y Antal, 1992).

De los múltiples diseños estadísticos de experimentos (DEE) (Montgomery, 2004), se eligió un diseño factorial completo  $2^4$ , es decir, cuatro factores con dos niveles por cada factor. Este tipo de DEE está planteado de forma que se varían simultáneamente varios factores pero se evita que se cambien siempre en la misma dirección. Además, la investigación se complementa de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos. Este diseño permite explorar el dominio experimental, y encontrar una dirección prometedora para la optimización posterior, descartando los factores que no muestren significación estadística alguna sobre las variables. En un plano secundario, también se analizará el comportamiento de todas

aquellas variables que en un momento dado puedan aportar información adecuada para el transcurso de la investigación

La Tabla 2 muestra el plan de experimentación obtenido mediante el uso del software matemático Design-Expert (versión 7.0.0). Las experiencias se realizaron en orden aleatorio con el fin de evitar que los efectos de distintos factores se confundan entre sí, introduciendo un sesgo en los valores de los efectos (Box y *col.*, 1978).

**Tabla 2. Plan de experimentación para el estudio de las variables de pretratamiento de la paja de trigo. Diseño factorial completo  $2^4$  (Diseño 1)**

<i>Experiencias</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>tiempo</i> <i>min</i>	<i>Sobrepresión</i> <i>bar</i>	<i>Carga de Sustrato</i> % (p/v)
<i>1</i>	170	0	0	5
<i>2</i>	200	0	0	5
<i>3</i>	170	40	0	5
<i>4</i>	200	40	0	5
<i>5</i>	170	0	30	5
<i>6</i>	200	0	30	5
<i>7</i>	170	40	30	5
<i>8</i>	200	40	30	5
<i>9</i>	170	0	0	10
<i>10</i>	200	0	0	10
<i>11</i>	170	40	0	10
<i>12</i>	200	40	0	10
<i>13</i>	170	0	30	10
<i>14</i>	200	0	30	10
<i>15</i>	170	40	30	10
<i>16</i>	200	40	30	10

### 3.2.1.2 Optimización de pretratamiento en una etapa (*Diseño 2*)

Esta fase del trabajo se desarrolló en un rango experimental delimitado por los factores temperatura y tiempo de residencia, que resultaron estadísticamente significativos sobre la variación de las variables respuesta en la anterior etapa de investigación. En relación a los demás factores estudiados, se decidió no aplicar sobrepresión en el reactor y utilizar una carga de sustrato del 10% (p/v). Con el objetivo de maximizar las variables respuesta seleccionadas se planteó un diseño de optimización central no rotado,  $2^2$ . Este tipo de diseños se usa en el modelado y análisis de problemas en los que la variable o variables de interés recibe la influencia de varios factores y donde el objetivo es la obtención de un valor máximo de una o varias respuestas.



Los valores de los niveles para los factores considerados, así como el plan de experimentación para esta etapa de la investigación se representan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Plan de experimentación para el estudio de la optimización del pretratamiento en una etapa.**  
Diseño de optimización central no rotado  $2^2$  (Diseño 2)

<i>Experiencias</i>	<i>Temperatura</i> °C	<i>Tiempo</i> min
<i>1</i>	170	0
<i>2</i>	220	0
<i>3</i>	170	40
<i>4</i>	220	40
<i>5</i>	170	20
<i>6</i>	220	20
<i>7</i>	195	0
<i>8</i>	195	40
<i>9</i>	195	20
<i>10</i>	195	20
<i>11</i>	195	20

Como se puede observar, se realiza un triplicado del punto central del diseño con el objetivo de estimar la desviación típica de cualquier observación y la de los efectos. La variación en las observaciones de dos o más réplicas es un reflejo de la variabilidad total que afecta a las observaciones hechas en diferentes condiciones experimentales (Box y col., 1978).

### 3.2.1.3 Optimización del pretratamiento en dos etapas

Para llevar a cabo el pretratamiento en dos etapas, y en base a la información aportada por las anteriores fases de la investigación, se establecieron dos regiones experimentales diferentes, una para optimizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida originada tras la primera etapa de pretratamiento (1ª Etapa), y otra para optimizar el rendimiento de liberación de glucosa mediante hidrólisis enzimática del residuo sólido insoluble obtenido en la 1ª etapa y sometido a un segundo pretratamiento (2ª Etapa). Un esquema de las fases seguidas en el desarrollo de la configuración del pretratamiento en dos etapas se muestra en la Figura 42.

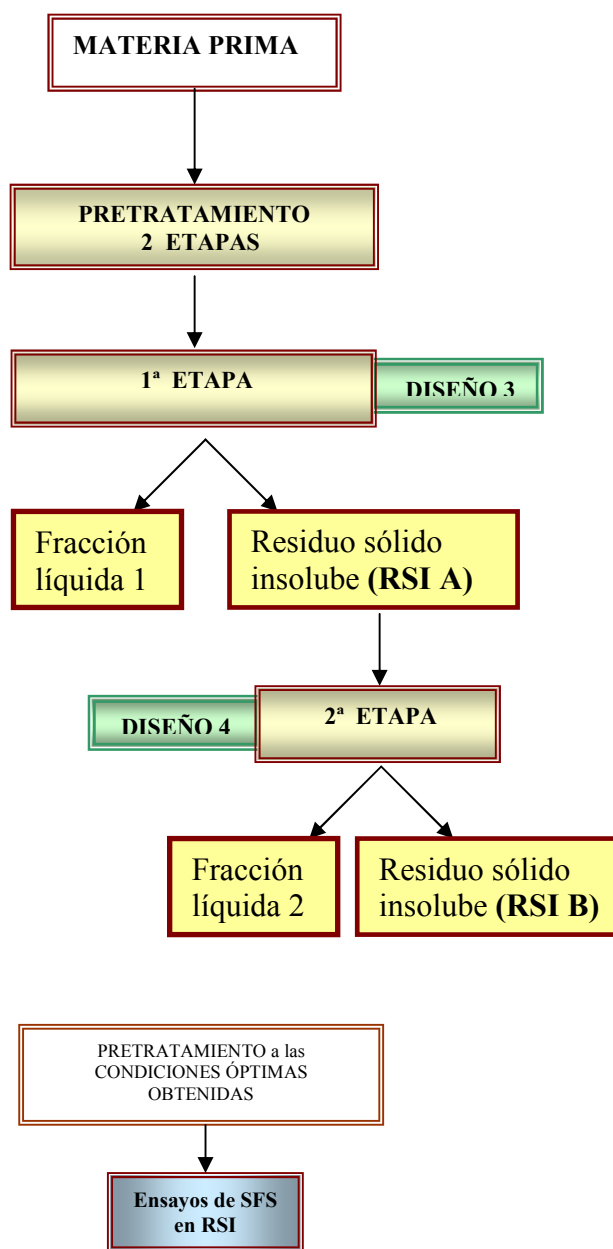


Figura 42. Esquema de las fases seguidas en el desarrollo de la configuración del pretratamiento en dos etapas

### 3.2.1.3.1 Primera etapa del pretratamiento en dos etapas

Con el objetivo de maximizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de la paja de trigo, se realizó un diseño de optimización

central,  $2^2$ , en la región experimental delimitada por los valores de los niveles de los factores temperatura y tiempo de residencia, representados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Plan de experimentación para la primera etapa del pretratamiento en dos etapas, dirigido a maximizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida (Diseño 3). Diseño de optimización central  $2^2$  rotado.**

<i>Experiencias</i>	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>
1	175	10
2	195	10
3	175	40
4	195	40
5	170,9	25
6	199,1	25
7	185	3,8
8	185	46,2
9	185	25
10	185	25
11	185	25

En la realización a los experimentos se consideró que 3,8 min (3 minutos y 48 segundos) equivaldrían a 4 min, y que 46,2 min (46 minutos y 12 segundos) equivaldrían a 46 min.

### *3.2.1.3.2 Segunda etapa del pretratamiento en dos etapas*

La segunda etapa del pretratamiento en dos etapas tiene como objetivo maximizar la liberación de glucosa por hidrólisis enzimática del RSI obtenido en las condiciones óptimas de pretratamiento de la primera etapa (RSI 1ª etapa de pretratamiento, en adelante RSI A), tras ser sometido a una segunda etapa de pretratamiento (RSI 2ª etapa de pretratamiento, en adelante RSI B). Para este fin, y en base a la información aportada por las anteriores etapas de la investigación, las condiciones experimentales realizadas vinieron definidas por los niveles de temperatura y el tiempo, representados en la Tabla 5.

**Tabla 5. Plan de experimentación para la segunda etapa del pretratamiento en dos etapas, dirigido a maximizar la eficacia de sacarificación del RSI procedente de la 2ª etapa (Diseño 4). Diseño de optimización central 2<sup>2</sup> rotado.**

<i>Experiencias</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>
1	200	3
2	240	3
3	200	15
4	240	15
5	191,7	9
6	248,3	9
7	220	0,5
8	220	17,5
9	220	9
10	220	9
11	220	9

Estos ensayos se realizaron utilizando como sustrato el RIS generado en la primera etapa, RSI A. Con el objetivo de obtener la suficiente cantidad de RIS para llevar a cabo todos los experimentos en un mismo material, se realizaron varios ensayos de pretratamiento a la condición óptima de 184 °C y 24 min sobre la materia prima. Los RSI obtenidos después de la filtración y lavado con agua desionizada, se mezclaron en un solo lote que se secó a 45°C y se utilizó como sustrato para la segunda etapa.

### 3.3 ENSAYOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Las pruebas de hidrólisis enzimática se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad. El sustrato utilizado fue el RSI obtenido después del pretratamiento según se ha descrito, en una carga del 4% (p/v). Las preparaciones enzimáticas empleadas en los ensayos fueron Celluclast 1.5 L FG y Novozym 188 (Novozymes A/S, Dinamarca), en una carga de 15 UPF/g sustrato de Celluclast 1.5L y 15 UI/g sustrato de Novozyme 188. Celluclast 1.5 L FG es un preparado líquido de celulasas producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada del hongo *Trichoderma reesei*, con una densidad de 1,2 g/ml. Novozym 188 es un preparado líquido de enzima celobiasa preparada mediante fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*, con una densidad de 1,18 g/ml.

Los ensayos se realizaron en agitación constante (150 r.p.m.) a 50 °C, en un agitador orbital Braun CERTOMAT-R. Se tomaron muestras a intervalos de 24, 48 y 72 horas. Las muestras se centrifugaron en una Centrífuga 5415D durante 10 minutos a 9.300 g y el sobrenadante se filtró y se analizó por HPLC la concentración de glucosa y, en algunos ensayos, también la concentración de xilosa, tal y como se describe en el apartado 3.5.2.1. Todos los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron por triplicado, utilizándose el valor medio del mismo. La desviación típica nunca superó el 4%.

### **3.4 ENSAYOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SFS)**

#### **3.4.1 Microorganismo fermentador. Preparación del inóculo**

El microorganismo utilizado en este trabajo fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (DER-CIEMAT nº colección 1701), el cual se conservó en tubos de agar inclinado con medio sólido a una temperatura de 4 °C. Para su utilización en el laboratorio, se preparó un preinóculo haciendo crecer el microorganismo, durante 24 h, en un medio líquido basal estéril (MLB: 2,5 g/l de extracto de levadura, 2 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,3 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), al que se añadieron 30 g/l de glucosa como fuente de carbono. Para la preparación del inóculo utilizado en los ensayos de SFS, se tomaron 100 µl de preinóculo, se añadieron a un MLB con 30 g/l de glucosa y se incubó durante 16 horas en un agitador orbital Braun CERTOMAT-R, a una temperatura de 35 °C y 150 r.p.m. de agitación.

#### **3.4.2 Pruebas de sacarificación y fermentación simultáneas**

Los ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, con 25 ml de agua desionizada, ajustando a pH 5. Como sustrato se utilizaron el residuo pretratado completo (RP) y el RSI lavado obtenido del pretratamiento a diferentes condiciones óptimas de proceso, en las concentraciones que se describen en los apartados siguientes. Las preparaciones enzimáticas empleadas en los ensayos fueron Celluclast 1.5 L FG, Novozym 188 y en el caso de la SFS descrita en el apartado 3.4.2.2, también se añadió xilanasas purificada NS50030 (Novozymes A/S, Dinamarca), en las dosis que se detallan más adelante. En todos los ensayos se añadió un 10% (v/v) (0,9-1,0 g células/l) de inóculo y se incubó la mezcla en un agitador orbital Braun CERTOMAT-R (150 r.p.m.) a 35 °C de temperatura.

#### 3.4.2.1 SFS con residuo pretratado a 188 °C y 40 min.

Para la realización de los ensayos de SFS sobre el residuo pretratado completo se planteó la necesidad de realizar un estudio previo de la fermentabilidad de la fracción líquida de dicho residuo, con el objeto de conocer el grado de inhibición que los compuestos solubles contenidos en la misma pueden ejercer sobre la levadura *S. cerevisiae*. Este estudio permite determinar si se puede plantear la utilización del residuo tal y como es generado en el pretratamiento, o se necesita realizar alguna dilución con el fin de evitar la inhibición.

##### 3.4.2.1.1 Estudios de fermentabilidad de la fracción líquida

Después del pretratamiento, el residuo pretratado (RP) presentó un porcentaje de sólidos totales del 10% (p/p), del que un 2% eran sólidos solubles. Para el estudio de la fermentabilidad se tomó la fracción líquida procedente de este residuo, mediante filtración, como la que contiene la máxima concentración de compuestos solubles a ensayar. A partir de la misma se prepararon 3 diluciones en agua: 1:1,3, 1:2 y 1:4, que corresponderían a un RP con un porcentaje de sólidos totales del 7,5% (p/p), 5% (p/p) y 2,5% (p/p), respectivamente. Los ensayos de fermentación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, con 25 ml de la correspondiente fracción líquida y la cantidad de glucosa necesaria para alcanzar una concentración final de 30 g/l. El pH fue ajustado a 5, mediante el uso de una disolución de NaOH 1N.

##### 3.4.2.1.2 Ensayos de SFS

Los resultados del estudio anterior mostraron que es necesario diluir el RP hasta un 7,5 % (p/p) de sólidos totales para poder llevar a cabo una SFS del mismo. Las pruebas de SFS se realizaron en las siguientes condiciones:

*Sustrato:* Residuo pretratado completo diluido hasta el 7,5% (p/p) de sólidos totales y ajustado a pH 5,0.

*Carga de enzima:* Celluclast 1.5L: 20 UPF/g celulosa.

Novozym 188: 20 UI/g celulosa.

*Inóculo:* 10% (v/v) (0,9-1 g células/l).

*Tiempo de incubación:* 96 horas.

*Temperatura:* 35 °C.

*Agitación:* 150 r.p.m.

### 3.4.2.2 SFS en los RSI del pretratamiento en dos etapas (219 °C y 6 min) y una etapa (214 °C y 2,7 min)

Con el objetivo de evaluar el potencial de producción de etanol a partir de los RSI obtenidos del pretratamiento en una (214 °C y 2,7 min) y dos etapas (219 °C y 6 min), se realizaron pruebas de sacarificación y fermentación simultáneas en las siguientes condiciones:

*Sustrato:* RSI pretratado a 214 °C y 2,7 min y RSI pretratado a 219 °C y 6 min.

*Concentración de sustrato:* 10% y 12% (p/v).

*Carga de enzima:* Celluclast 1.5L: 20 UPF / g celulosa.

Novozym 188: 20 UI / g celulosa.

Xilanasa Purificada NS50030: 5% (enzima/sustrato) (v/p)

*Inóculo:* 10% (v/v) (0,9-1 g células/l).

*Tiempo de incubación:* 96 horas.

*Temperatura:* 35 °C.

*Agitación:* 150 r.p.m.

## 3.5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En este apartado se indican los métodos analíticos utilizados para caracterizar la materia prima, tanto nativa como pretratada, la fracción líquida originada como consecuencia del pretratamiento, los productos de hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica y las concentraciones finales de etanol.

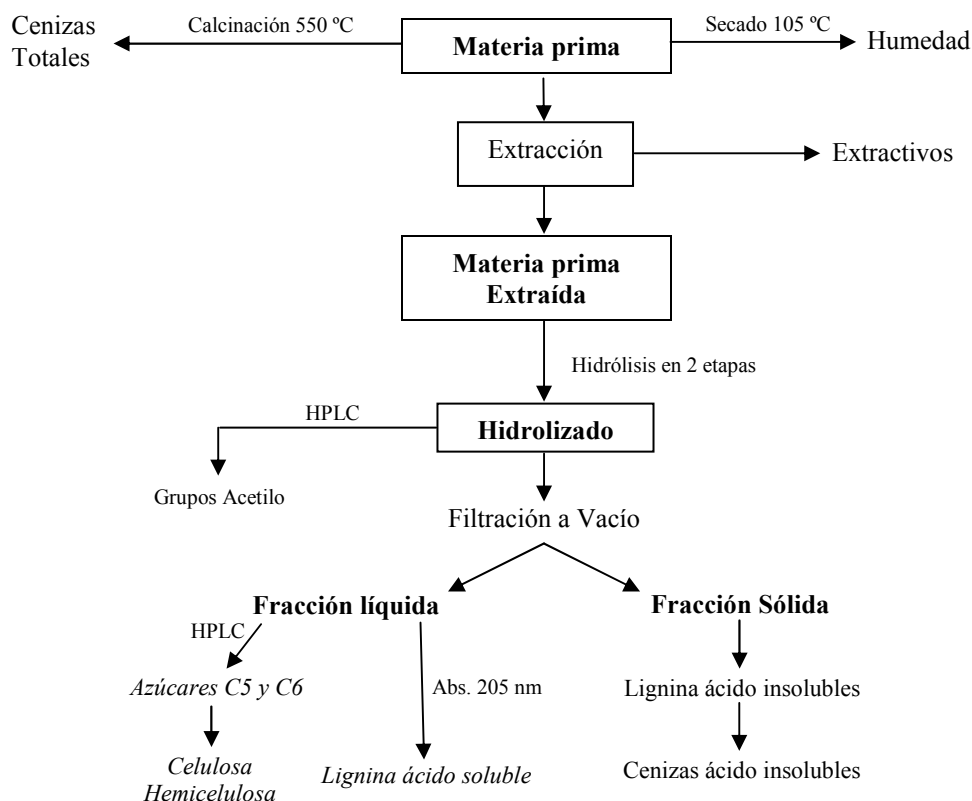
### 3.5.1 Caracterización de la materia prima y del material pretratado

La caracterización de la materia prima y el RSI obtenido tras el pretratamiento se realizó siguiendo el esquema mostrado en la Figura 43, según los procedimientos de análisis de biomasa del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) (Colorado, Estados Unidos) (Anexo II).

A partir de la realización de estos análisis se conoce la composición del material en cuanto a su contenido en carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa), lignina, extractivos y cenizas. El contenido en estos componentes se expresa en base a peso seco, por lo

que el primer análisis de esta metodología contempla el cálculo de la de humedad de la materia prima.

En cuanto al contenido en extractivos, es importante señalar que la metodología establece que en los materiales en los que este contenido es elevado, o cuando se desea cuantificar los compuestos solubles en agua que tiene el material, es necesario realizar esta extracción previamente al análisis del resto de componentes para evitar interferencias o poder conocer el contenido en sustancias solubles. En el caso de la paja de trigo, y siguiendo esta recomendación, el protocolo de análisis se realizó en muestras que previamente se habían sometido a extracción (biomasa libre de extractivos), según se muestra en la Figura 43. Posteriormente se efectuó la pertinente corrección a la biomasa sin extraer.



**Figura 43. Procedimiento seguido para la caracterización de la materia prima**

En los residuos pretratados únicamente se realizó la determinación de carbohidratos y lignina sin el paso previo de extracción.



### 3.5.2 Caracterización de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento

Los principales compuestos analizados en la fracción líquida fueron los azúcares, el ácido acético y los productos de degradación.

#### 3.5.2.1 Azúcares

Los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa) fueron analizados mediante un cromatógrafo de líquido HPLC, modelo 2695 de Waters (Mildford, MA, EEUU), equipado con un detector de índice de refracción, Waters 2414, una columna cromatográfica Carbosep CHO-682 Lead, con resina en forma iónica de plomo de 300 mm x 7,8 mm de diámetro interno, de la firma comercial Transgenomic (Omaha, NE, EEUU). La temperatura de trabajo fue de 80 °C y como fase móvil se utilizó agua de calidad reactiva Millipore (Billerica, MA, EEUU), a un flujo de 0,5 ml/min.

Las muestras de análisis fueron sometidas a un tratamiento previo con el objetivo de eliminar las sales que puedan interferir en el análisis. Las muestras se filtraron a través de una resina de intercambio iónico que, en las muestras ácidas, produce el efecto de neutralización. Por último, antes de ser introducidas en el cromatógrafo, se pasan a través de un filtro de nitrocelulosa Millipore con un tamaño de poro de 0,45 micras, con el objetivo de eliminar las posibles impurezas restantes.

El análisis de todos los azúcares se realizó en la fracción líquida originada tras el pretratamiento, mientras que en los medios de ensayo de HE únicamente se determinó glucosa, y en algunos experimentos, se completó con el análisis de la xilosa procedente de la hidrólisis del xilano.

#### 3.5.2.2 Productos de Degradación

El análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EEUU) modelo 1100, con un detector UV de fotodiodos (Diodo Array) HP 1040A. Se utilizó una columna cromatográfica Aminex HPX-87H (Sulfonated divinyl benzene styrene copolymer) (Bio-Rad Labs, CA, EEUU), con resina en forma iónica de hidrógeno de 300 mm x 7,8 mm de diámetro interno. La temperatura de trabajo fue de 55 °C. La fase móvil fue una mezcla (v/v) de 82% ácido sulfúrico 5 mM y 18% acetonitrilo a un flujo de 0,3 ml/min.

La determinación analítica de los ácidos acético, fórmico y levulínico se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos modelo 590 de Waters, provisto de un detector de índice de refracción, modelo 410, de la misma casa comercial. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna de acero inoxidable, Aminex HPX-87H, de 300 mm x 7.6 mm de diámetro interno. La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0,6 ml/min y 65 °C de temperatura de columna.

### 3.5.3 Determinación de Etanol

El etanol se analizó mediante cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II equipado con un inyector automático Agilent (Santa Clara, CA, EEUU) serie 6890, a una temperatura de 175 °C. Como detector se utilizó un detector de ionización de llama (FID). La columna empleada fue una columna Carbowax 20M (2 m x 1/8 in) a 85 °C. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 30 ml/min.

## 3.6 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Con el fin de evaluar los efectos que tienen las diferentes condiciones de pretratamiento estudiadas sobre la paja de trigo, se utilizan una serie de parámetros que hacen referencia a los cambios producidos en la materia prima como consecuencia de dicho pretratamiento. A continuación se describe el procedimiento para el cálculo de dichos parámetros. Todos los materiales sólidos definidos en las distintas ecuaciones se consideran en base al peso seco (bps).

- *Porcentaje de Recuperación de Sólidos (% RS)*

Este parámetro da información sobre la cantidad de materia prima solubilizada como consecuencia del efecto del pretratamiento. Se define como la cantidad de material sólido obtenido después de la etapa de pretratamiento, en relación a la cantidad de materia prima introducida, mediante la siguiente fórmula:

$$\% RS = \frac{\text{g RSI}}{\text{g materia prima introducida}} \times 100$$

En el caso concreto del pretratamiento en dos etapas (DP), se calcula un porcentaje de recuperación global representativo de las dos etapas de pretratamiento:

$$\% RS (DP) = \frac{\% RS \text{ 1ª Etapa}(RS1) \times \% RS \text{ 2ª Etapa}(RS2)}{100}$$

- *Concentración de un componente en el RSI*

La concentración de cada componente en el RSI se calcula en base a los resultados del análisis descrito en el punto 3.5.1, expresado como un porcentaje referido al peso seco del material pretratado.

$$\% \text{ componente} = \frac{\text{g componente en RSI}}{100 \text{ g RSI}}$$

- *Recuperación de componentes de la materia prima tras el pretratamiento.*

Esta variable hace referencia a la cantidad de cada componente en la fracción considerada (RSI o fracción líquida) en base a su contenido en la materia prima. Este índice proporciona información sobre la recuperación de dicho componente después de la etapa de pretratamiento:

- *En la fracción sólida*, el cálculo se realiza:

$$\% \text{ Recuperación de componente} = \frac{\text{g componente en el RSI} \times \% RS}{\text{g componente en la materia prima}}$$

Para el pretratamiento en dos etapas, la recuperación del componente en base a su contenido en la materia prima, se calcula mediante el porcentaje de recuperación de sólidos definido para el DP.

$$\% \text{ Recuperación de componente (DP)} = \frac{\text{g componente en el RSI} \times \% RS (DP)}{\text{g componente en la materia prima}}$$

- *En la fracción líquida*, el cálculo se realiza:

$$\% \text{ Recuperación de Componente} = \frac{\text{g componente en la FL}}{\text{g componente en la materia prima}} \times 100$$

En el caso de la recuperación de azúcares hemicelulósicos (en adelante, RAH) del pretratamiento en dos etapas, este dato se obtuvo considerando las cantidades de éstos en las dos fracciones líquidas generadas en ambas etapas del proceso, es decir:

$$\text{RAH (DP)} = \% \text{ RAH FL1} + \% \text{ RAH FL2}$$

teniendo en cuenta que:

$$\% \text{ RAH FL1} = \frac{\text{g azúcares hemicelulósicos en la FL1}}{\text{g azúcares hemicelulósicos en la materia prima}} \times 100$$

$$\% \text{ RAH FL2} = \frac{\text{g azúcares hemicelulósicos en la FL2}}{\text{g azúcares hemicelulósicos en la materia prima}} \times \% \text{RS1}$$

siendo FL1 y 2, las fracciones líquidas generadas en la primera y segunda etapa del pretratamiento, respectivamente, y % RS1, el porcentaje de recuperación de sólidos de la primera etapa del doble pretratamiento.

#### ● *Índices de Hidrólisis Enzimática*

Expresan la cantidad de azúcar liberado durante esta etapa, en relación a la cantidad de azúcar potencial en el material pretratado o en la materia prima. Estos índices, proporcionan información acerca de la susceptibilidad del RSI al ataque enzimático resultando, por tanto, una importante variable de la efectividad del pretratamiento. Se definen:

- Eficacia de sacarificación (ES), rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática expresado en base al contenido en azúcar potencialmente extraíble del RSI.

$$\% \text{ ES} = \frac{\text{g azúcar obtenido en HE}}{\text{g azúcar en RSI}} \times 100$$

- Rendimiento de hidrólisis enzimática (RHE), rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática en relación al contenido en azúcar potencialmente extraíble de la materia prima. Esta variable representa un indicador de la eficacia de sacarificación en relación a la materia prima.

$$\% \text{ RHE} = \frac{\frac{\text{g azúcar obtenido en HE}}{\text{g RSI}} \times \% \text{ RS}}{\text{g azúcar en materia prima}}$$

Para el caso concreto del DP, esta variable se determina teniendo en cuenta el residuo sólido insoluble obtenido tras las dos etapas de pretratamiento, RSI B, y mediante el porcentaje de recuperación de sólidos definido para esta configuración de proceso %RS (DP), es decir:

$$\% \text{ RHE} = \frac{\frac{\text{g azúcar obtenido en HE}}{\text{g RSI B}} \times \% \text{ RS (DP)}}{\text{g azúcar en materia prima}}$$

● *Rendimiento global de azúcares*

Esta variable hace referencia a la cantidad de azúcar de la materia prima que ha sido convertido a forma monomérica, y por lo tanto, susceptible de ser fermentado, tras las etapas de pretratamiento e hidrólisis. Se calcula como la suma del contenido de azúcar en la fracción líquida (FL) más el generado en la HE, referido al contenido de azúcar en la materia prima,

$$\% \text{ RGA} = \frac{\left( \frac{\text{g azúcar en HE}}{\text{g RSI}} \times \frac{\% \text{ RS}}{100} \right) + \left( \frac{\text{g azúcar en la FL}}{\text{g materia prima}} \right)}{\text{g azúcar en la materia prima}} \times 100$$

En el caso del pretratamiento en dos etapas, el cálculo es igual, pero considerando los azúcares hemicelulósicos solubilizados en la fracción líquida generada en la primera etapa del pretratamiento. La RGA después del DP se calcula mediante la ecuación:

$$\% \text{ RGA} = \frac{\left( \frac{\text{g azúcar en HE}}{\text{g RSI B}} \times \frac{\% \text{ RS(DP)}}{100} \right) + \left( \frac{\text{g azúcar en la FL1}}{\text{g materia prima}} \right) + \left( \frac{\text{g azúcar en la FL2}}{\text{g componente RSI A}} \times \frac{\% \text{ RSI}}{100} \right)}{\text{g azúcar en la materia prima}} \times 100$$

siendo FL1 y FL2 las fracciones líquidas generadas en la primera y segunda etapa del pretratamiento, y RSI A y B los residuos sólidos insolubles de la primera y segunda etapas, respectivamente.

● *Rendimiento de Etanol ( $Y_E$ ).*

El rendimiento en la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se calcula normalmente como porcentaje de un rendimiento teórico que considera una eficacia de sacarificación de la celulosa del 100%, y un rendimiento de fermentación de 0.51 g etanol/g glucosa. En este trabajo, se ha considerado como eficacia de sacarificación teórica el 90%, ya que en ningún ensayo se superó este porcentaje. En cuanto al rendimiento teórico de fermentación, se utilizó el dato calculado experimentalmente del rendimiento de fermentación de la levadura utilizada sobre un medio sintético de glucosa, que dio un valor de 0,47 g etanol/g glucosa. Por ello, la ecuación que define el rendimiento de SFS en esta investigación es la siguiente:

$$Y_E = \frac{\text{g etanol}}{[\text{g glucosa en RSI} \times (0,90)] \times 0,47} \times 100$$

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto para el diseño de experimentos, como para el análisis de los resultados experimentales obtenidos, se utilizó el programa estadístico Design Expert, versión 7.0.0 (Statease, Inc, MN, EEUU). En algunas fases de la investigación, con el objetivo de encontrar correlación estadística entre los valores de determinadas variables respuesta, se utilizó el Statgraphics Plus 5.0 (StatPoint, Inc, Virginia, EEUU).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





#### 4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La paja de trigo utilizada como materia prima en esta investigación fue caracterizada según los métodos de análisis descritos en el apartado 3.5.1. A lo largo del desarrollo del trabajo se utilizaron dos lotes de paja diferentes cuyas composiciones se muestran en la Tabla 6. Las variaciones encontradas en la composición entre los dos lotes podrían deberse a distintos factores, como los señalados por Öhgren (2006) en relación al bagazo de maíz: tipo y cantidad de fertilizante que se haya utilizado durante la etapa de cultivo, el contenido en minerales del suelo, o de la madurez que haya alcanzado el grano.

**Tabla 6. Composición de la paja de trigo (% bps). Los valores son media de 5 repeticiones; entre paréntesis, el error de la estimación de la medida (intervalo de confianza 95%)**

COMPONENTE	Lote 1	Lote 2
Celulosa	<b>38,1</b>	<b>37,2</b>
Glucosa	41,95 (1,4)	40,90 (1,1)
Hemicelulosa	<b>25,4</b>	<b>21,2</b>
Xilosa	25,77 (0,5)	21,30 (0,7)
Arabinosa	1,82 (0,3)	1,59 (0,5)
Galactosa	1,12 (0,7)	1,08 (0,4)
Lignina Acido Insoluble	<b>16,33</b> (0,4)	<b>19,62</b> (0,6)
Lignina Soluble	2,58 (0,6)	2,61 (0,7)
Grupos Acetilo	<b>1,58</b> (0,2)	<b>1,4</b> (0,3)
Extractivos	<b>15,26</b> (0,7)	<b>14,54</b> (0,9)
Cenizas	6,40 (0,5)	4,19 (0,6)

Como se puede observar en la Tabla 6, los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) conforman aproximadamente un 60% del material inicial seco, lo cual hace a este residuo un sustrato muy adecuado para la producción de etanol. El componente hemicelulósico está formado principalmente por xilosa (90%) y pequeñas cantidades de arabinosa, galactosa y grupos acetilo. Los grupos acetilo se encuentran en menor cantidad que en otros materiales herbáceos (2%) y que en maderas duras (3,6%), donde los xilanos se encuentran altamente acetilados (Fengel y Wegener, 1989). El grado de lignificación de la paja de trigo está en el rango de lo descrito para otros residuos agrícolas como el bagazo del maíz (17-19%) (Kim y Holtzapple, 2005a). Por otro lado, los extractivos constituyen una parte importante de la materia prima, sobre el 15%. El alto contenido en cenizas de la paja de trigo (4,8%) puede estar justificado por la presencia de compuestos derivados del uso de fertilizantes en cultivos y de

sílice procedente de contaminación de arena del suelo durante la cosecha y el transporte (Olanders y Steenari, 1995).

## **4.2 PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE TRIGO MEDIANTE AGUA CALIENTE EN FASE LÍQUIDA**

La investigación que se presenta tiene por objeto la optimización de las condiciones del pretratamiento de la paja de trigo, mediante agua caliente líquida (ACL), para su posterior bioconversión a etanol combustible. Para ello, el trabajo se ha desarrollado en una serie de etapas (Figura 44) que, mediante la aplicación de una metodología basada en el diseño estadístico de experimentos, condujeron a la determinación de las condiciones óptimas de pretratamiento en dos configuraciones de proceso: en una y en dos etapas. Finalmente, se evaluó el potencial de producción de etanol a partir de los materiales pretratados en las condiciones óptimas de las configuraciones estudiadas. Las distintas fases del trabajo, representadas en la Figura 44, fueron las siguientes:

- *Estudio del efecto de los variables que afectan al proceso de pretratamiento mediante agua calienten fase líquida (Diseño 1).*

El objetivo de esta etapa experimental fue la determinación de la importancia, tanto cualitativa como cuantitativa, de una serie variables de pretratamiento (factores) que afectan al rendimiento del proceso: temperatura, tiempo, carga de sustrato y aplicación de sobrepresión en el reactor. Para los factores tiempo y temperatura se realizó un estudio previo del intervalo de trabajo más adecuado. Los cuatro factores fueron analizados mediante un diseño experimental factorial completo  $2^4$  (**Diseño 1**) con el objetivo de evaluar los cambios producidos en el material pretratado como consecuencia del efecto del pretratamiento. Para ello se eligieron los parámetros “recuperación de azúcares en la fracción líquida” (RAH) y “eficacia de sacarificación del RSI” (en adelante variables respuesta), como medida de la efectividad del pretratamiento en cuanto a la liberación de azúcares potencialmente fermentables.

A continuación, y en base a la información adquirida hasta el momento, se decidió realizar la optimización de las condiciones de tiempo y temperatura de pretratamiento de la paja de trigo con el objetivo de obtener una máxima recuperación global de azúcares potencialmente fermentables a etanol. Para ello se estudiaron dos configuraciones de pretratamiento, en una y dos etapas.

- *Pretratamiento en una etapa*

Esta configuración de pretratamiento se abordó de dos maneras diferentes, dependiendo del objetivo planteado. El primer esquema de trabajo buscaba encontrar las condiciones de tiempo y temperatura que resultaran en un máximo de recuperación de azúcares en las dos fracciones obtenidas tras el pretratamiento: fracción líquida y residuo sólido insoluble (RSI). La optimización de ambas variables respuesta se realizó mediante un análisis de respuesta múltiple en base a un diseño de experimentos de composición central,  $2^2$ , (**Diseño 2**).

En esta misma configuración de pretratamiento en una etapa, se planteó como objetivo alternativo la búsqueda de las condiciones de tiempo y temperatura que hicieran máxima sólo la liberación de azúcares por hidrólisis enzimática a partir del RSI, ya que la glucosa procedente de la celulosa constituye la mayor parte de los azúcares que actualmente pueden fermentarse con microorganismos disponibles a nivel industrial. Esta optimización pudo realizarse con el mismo diseño experimental anterior (**Diseño 2**), mediante un análisis simple de la eficacia de sacarificación del RSI obtenido en las diferentes condiciones de proceso.

En este punto del trabajo se confirmó la dificultad de encontrar una máxima recuperación de azúcares hemicelulósicos y un sustrato altamente susceptible al ataque enzimático en una sola etapa de proceso. Por lo tanto, se decidió plantear un pretratamiento en dos etapas; una primera etapa en la que se establecieran las condiciones para una máxima RAH en la fracción líquida, y una segunda etapa, en la cual se utilizaría el residuo sólido pretratado resultante de la primera etapa para estudiar las condiciones que condujeran a una máxima liberación de glucosa de la celulosa por hidrólisis enzimática.

- *Pretratamiento en dos etapas*

Primera etapa de pretratamiento. En esta fase del trabajo se realizó un diseño de optimización de composición central  $2^2$  (**Diseño 3**), construido para la optimización de la recuperación de azúcares en la fracción líquida. Para ello, se estableció una nueva región experimental delimitada por los valores de temperatura y tiempo: 175-195 °C y 10-40 min.

Segunda etapa de pretratamiento. El sustrato pretratado en las condiciones óptimas para una máxima RAH, se sometió a un segundo pretratamiento para obtener un residuo con una alta digestibilidad enzimática que permitiera alcanzar altos rendimientos en HE. Para ello se construyó un nuevo diseño (**Diseño 4**) de composición central,  $2^2$ , en el intervalo de 200-240 °C de temperatura y 3-15 min de tiempo.

• *Ensayos de SFS*

Se realizaron diferentes ensayos de sacarificación y fermentación simultánea sobre los materiales pretratados obtenidos en las diferentes condiciones óptimas de pretratamiento de la paja de trigo en una y en dos etapas, con el objetivo de evaluar el potencial de producción de etanol de dichos residuos.

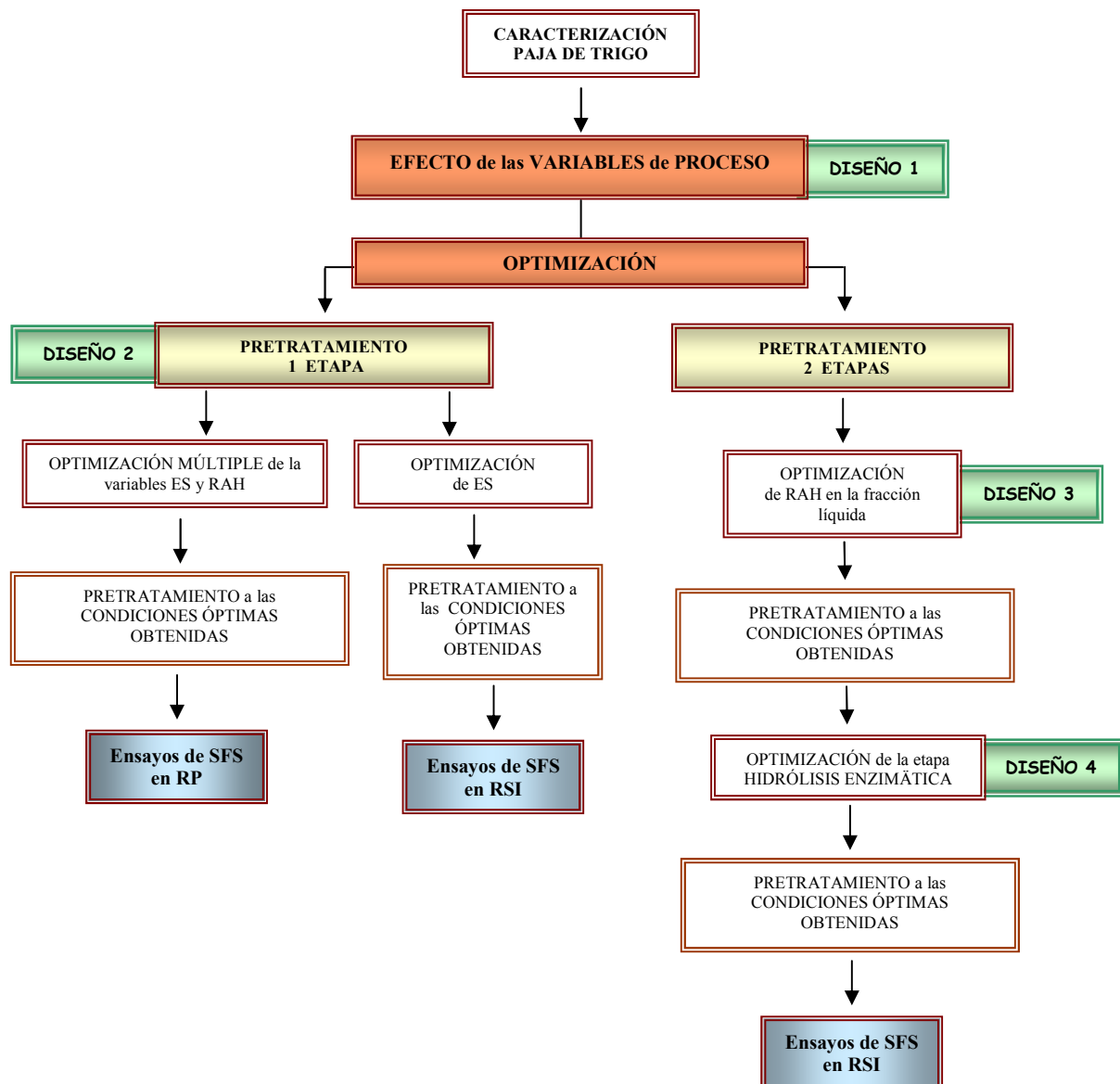


Figura 44. Esquema representativo de las distintas etapas de trabajo llevadas a cabo en esta investigación

#### **4.2.1 Efecto de las variables de proceso en el pretratamiento**

En esta primera fase del trabajo se estudió el efecto de las variables del proceso de pretratamiento por agua caliente líquida, en cuanto a la composición química y digestibilidad del material pretratado en comparación con la materia prima. En primer lugar, se determinó el intervalo de tiempo y temperatura de trabajo más adecuado para el pretratamiento de la paja de trigo, y, posteriormente, mediante la metodología del DEE, se abordó un estudio más amplio sobre el efecto de los factores que afectan al PACL de la paja de trigo, en el cual, además de la temperatura de proceso y el tiempo de residencia, también se incluyó la carga de sustrato y la sobrepresión añadida en el reactor.

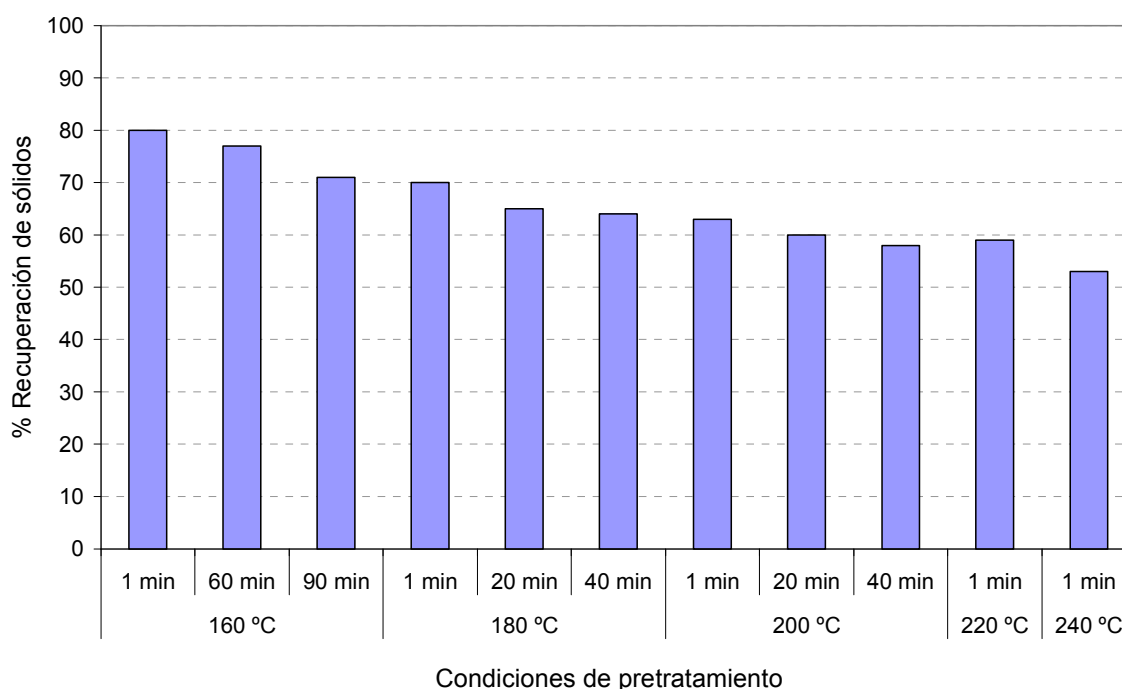
##### **4.2.1.1. Determinación del intervalo de trabajo de tiempo y temperatura**

Para el estudio del intervalo de tiempo y temperatura se realizó el pretratamiento en un amplio rango de condiciones de temperatura (160 a 240 °C) y tiempo de residencia en el reactor (1 a 90 min), con el fin de acotar el intervalo experimental para los posteriores estudios de optimización.

La evaluación del efecto de las diferentes condiciones de temperatura y tiempo se realizó determinando la recuperación de azúcares en el RSI y la fracción líquida tras el pretratamiento en relación a la materia, para lo que en primer lugar se determinó la recuperación de sólidos después de cada ensayo. Además, se evaluó la susceptibilidad al ataque enzimático del RSI con el fin de determinar el potencial de liberación de azúcares fermentables a partir de los carbohidratos contenidos en el mismo, mediante ensayos estándares de hidrólisis con enzimas comerciales.

##### *4.2.1.1.1 Recuperación de sólidos*

Los valores de recuperación de sólidos se muestran en la Figura 45. Como puede observarse, los valores disminuyen a medida que aumenta la temperatura y el tiempo desde un 80 a un 53%, debido principalmente, a la progresiva solubilización de algunos componentes de la materia prima como son los azúcares hemicelulósicos, los extractivos y las cenizas solubles. Estos son los compuestos que más fácilmente se solubilizan en este tipo de pretratamiento hidrotérmico, ya que su estructura es menos compleja que la de otros componentes de la biomasa. Por otra parte, las bajas recuperaciones de sólidos ocurridas a elevadas temperatura y tiempos prolongados pueden estar relacionadas con fenómenos como la volatilización de compuestos ocurridos durante el pretratamiento en condiciones severas descrita por Mok y Antal (1992).



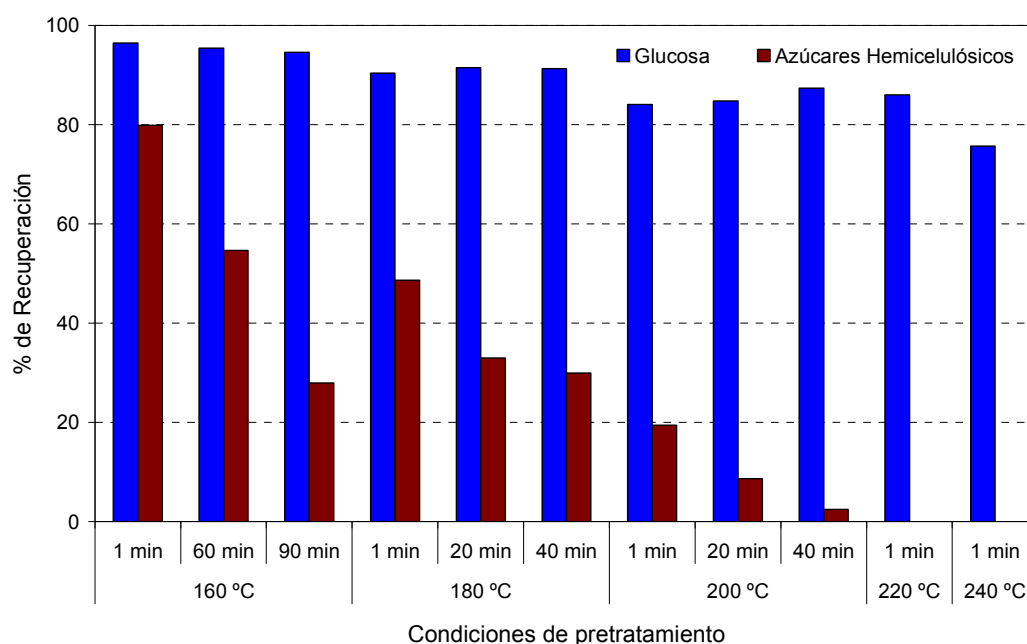
**Figura 45. Porcentaje de recuperación de sólidos obtenido tras el pretratamiento de la paja de trigo en diferentes condiciones de pretratamiento**

#### 4.2.1.1.2 Recuperación de azúcares en RSI

El rendimiento de recuperación de azúcares en el RSI obtenido en las diferentes condiciones de pretratamiento se muestra en la Figura 46. En lo que se refiere a la recuperación de glucosa, en todas las condiciones de pretratamiento ensayadas se obtuvieron valores por encima del 90%, excepto para 240 °C, donde se obtuvo una recuperación del 75%. Estos resultados indican que elevadas temperaturas por encima de 220 °C en la paja de trigo resultan en una cierta solubilización de la celulosa del sustrato. En base a la gráfica mostrada en la Figura 46, parece ser que el aumento de la temperatura hasta 220 °C ejerce un suave efecto negativo sobre los rendimientos de recuperación de glucosa, mientras que el efecto del tiempo de residencia resulta inapreciable a las temperaturas de 180 °C y 200 °C.

En cuanto a la recuperación de hemicelulosa en el RSI, puede observarse como la temperatura y tiempo ejercen un gran efecto sobre la liberación de los azúcares hemicelulósicos de la materia prima, disminuyendo su contenido en el RSI a medida que aumenta la severidad del pretratamiento. Así, los valores disminuyen desde un 80% a la condición más suave de 160 °C y 1 minuto hasta un 4% a 200 °C y 40 minutos. A partir de los 220 °C no se detectan azúcares derivados de hemicelulosa en el RSI. No obstante, y como se verá en el siguiente punto,

el hecho de que no se encuentre hemicelulosa en el RSI no siempre se traduce en una recuperación de los azúcares derivados en la FL, debido a los fenómenos de degradación que pueden ocurrir a elevadas temperaturas.

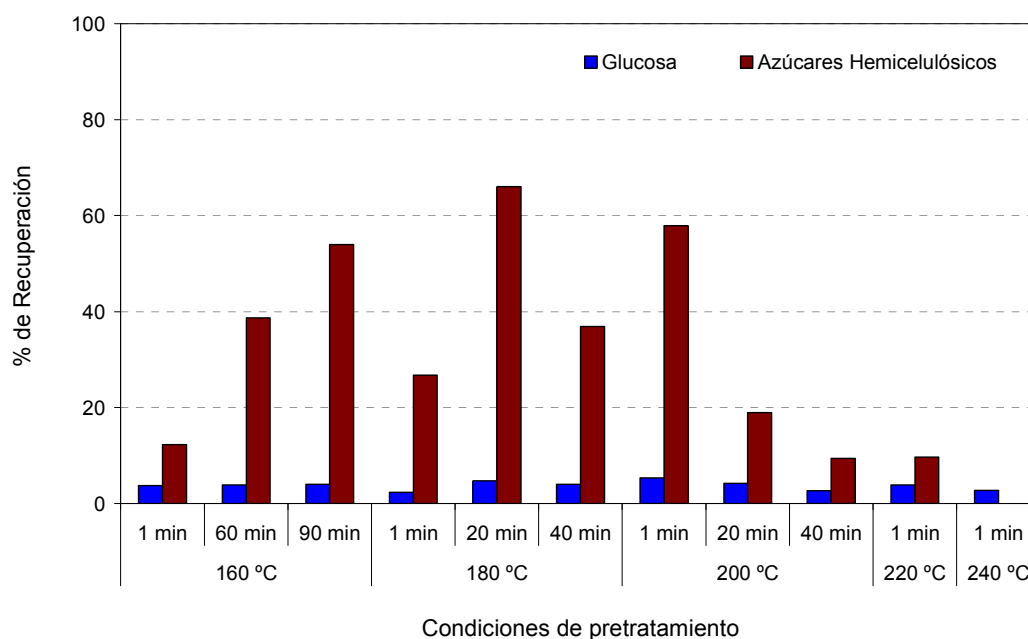


**Figura 46. Recuperación de azúcares en el RSI (expresado como un porcentaje del contenido de azúcar en la materia prima), obtenido después del pretratamiento de la paja de trigo mediante ACL en diferentes condiciones de proceso**

#### 4.2.1.1.3 Recuperación de azúcares en la fracción líquida.

En la Figura 47, se muestran los valores de recuperación de azúcares en la fracción líquida, calculados como un porcentaje del contenido de azúcar en la materia prima. La glucosa liberada como consecuencia de la acción del pretratamiento hidrotérmico fue menos del 4% en todas las condiciones experimentales, no mostrando efecto alguno el incremento de temperatura y tiempo. El hecho de encontrar glucosa en la fracción líquida, incluso en las condiciones de pretratamiento más suaves, sugiere que ésta procede de otra fuente distinta a la celulosa. La materia prima utilizada podría contener cierta cantidad de almidón, lo que explicaría el origen de la glucosa fácilmente solubilizable. Por otra parte, se ha descrito que la glucosa constituye el tercer azúcar mayoritario del componente hemicelulósico en la paja de trigo (Sun y Tomkinson, 2003) y se podría pensar que parte de esta glucosa fácilmente liberada procediera de este componente. No obstante, el hecho de que los valores sean similares en todas las condiciones ensayadas apoya la hipótesis de un origen externo.

Por el contrario, la temperatura y el tiempo de residencia sí muestran un claro efecto sobre los valores de recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida. De los tres azúcares medidos; xilosa, arabinosa y galactosa, la xilosa fue el mayoritario, representando el 90% del componente hemicelulósico. A temperaturas suaves de 160 y 180 °C, el incremento del tiempo desde 1 hasta 90 y 20 min, respectivamente, dio lugar a un aumento de los rendimientos de recuperación de azúcares de 12% a 54% y de 27% a 65%. Sin embargo, a 200 °C, un aumento del tiempo de residencia de 20 a 40 min, provocó un descenso en el valor de recuperación hasta el 10%. Este descenso tiene su origen en la degradación que los azúcares hemicelulósicos sufren a elevadas condiciones de temperatura y tiempo de residencia (Li y *col.*, 2005) dando lugar a compuestos de más bajo peso molecular, que en ocasiones pueden llegar a interferir negativamente en los posteriores procesos de hidrólisis y fermentación (García-Aparicio y *col.*, 2006). El máximo valor de recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida, 65%, se obtuvo a 180 °C y 20 min.



**Figura 47. Recuperación de azúcares en la fracción líquida (expresado como un porcentaje del contenido de azúcar en la materia prima) obtenida después del pretratamiento de la paja de trigo a diferentes condiciones de proceso**

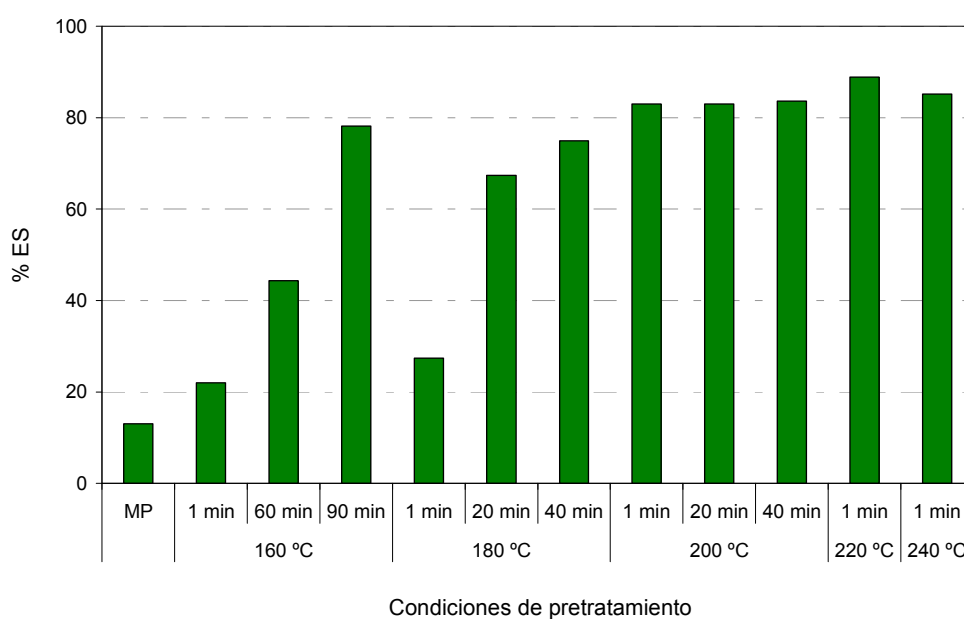
Los resultados muestran que la experimentación en torno a 160 °C de temperatura requeriría un largo tiempo de residencia (90 min) si se desea alcanzar recuperaciones de azúcares hemicelulósicos cercanas al 60%. Por otra parte, a 220 y 240 °C, donde no se detecta hemicelulosa en el RSI, se obtienen una baja o nula recuperación de azúcares hemicelulósicos, lo que indica una elevada degradación de estos azúcares. Por tanto, trabajar a elevadas



temperaturas, dentro del rango experimental estudiado, no resulta adecuado para alcanzar máximos valores de recuperación de azúcares hemicelulósicos.

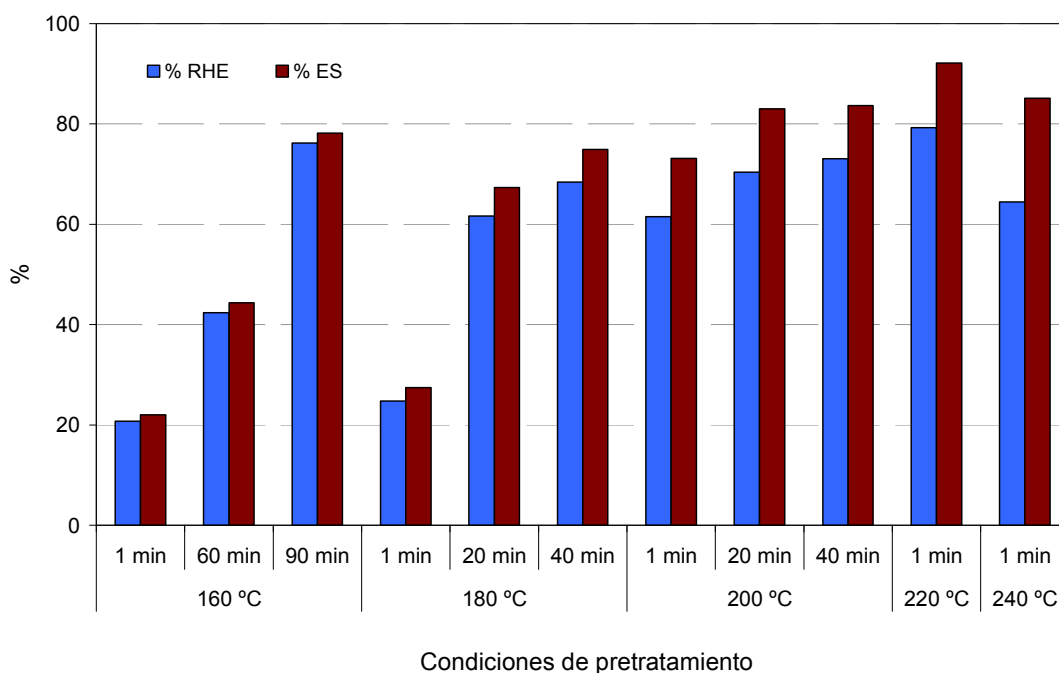
#### 4.2.1.1.4 Susceptibilidad al ataque enzimático del RSI

La accesibilidad de la celulosa del material pretratado al ataque enzimático es una de las variables más importante para medir la efectividad del pretratamiento. Los resultados de los ensayos de hidrólisis enzimática (HE) (Figura 48) se expresaron como “eficacia de sacarificación” (ES), calculada como glucosa en el medio de HE/glucosa potencial en el RSI. En la mayoría de las condiciones ensayadas, los porcentajes de ES se encontraron entre el 75 y el 85% del teórico. La comparación de estos resultados con el obtenido sobre la materia prima sin pretratar (13% del teórico), indica que el PACL mejora considerablemente la accesibilidad enzimática del RSI. En cuanto al efecto del tiempo de residencia en la ES, en la Figura 48 puede observarse como este factor ejerce un importante efecto sobre dicha variable a bajas temperaturas. A 160 °C, los rendimientos ascendieron desde 22% a 1 min a 78% a 90 min. A la temperatura de 180 °C se observa un efecto similar, con valores que ascienden desde un 27,4 hasta un 74,9% del teórico, cuando el tiempo incrementa de 1 a 40 min. Se observa que los valores de ES muestran una fuerte dependencia con la temperatura del pretratamiento a tiempos cortos, incrementando desde el 22% a 160 °C y 1 min hasta 88-85% a las más altas temperaturas de proceso, 220 y 240 °C a tiempo 1 min. El máximo rendimiento de conversión de celulosa en glucosa fue del 89% del teórico y se obtuvo en la condición experimental de 220 °C y 1 min.



**Figura 48.** Eficacia de sacarificación (ES) (expresado como g glucosa/100 g de glucosa en RSI) obtenida sobre paja de trigo pretratada a diferentes condiciones de proceso

Otra de las variables que resulta interesante analizar es el rendimiento de HE referido al contenido en glucosa de la materia prima (RHE). Este parámetro, además de ofrecer información sobre los cambios en la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático, tiene en cuenta la pérdida de sólidos que ocurre durante el pretratamiento, por lo que podría decirse que es un índice que engloba ambas etapas, en lo que a conversión de celulosa por HE se refiere. La Figura 49 muestra una comparación entre las dos variables calculadas en las distintas condiciones de experimentación.



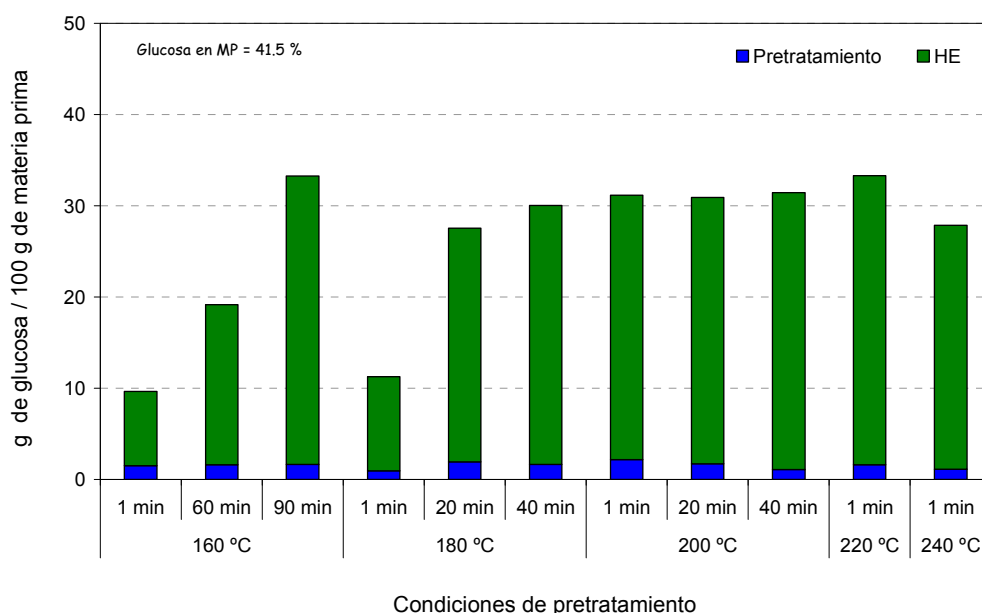
**Figura 49. Comparación entre eficacia de sacarificación (ES, expresado como g glucosa/100 g de glucosa en RSI) y rendimiento de hidrólisis enzimática (RHE, expresado como g glucosa/100 g de glucosa en materia prima), obtenidos sobre paja de trigo pretratada en diferentes condiciones de proceso**

El hecho de que los porcentajes de hidrólisis sobre el material pretratado y sobre la materia prima sean coincidentes en muchas de las condiciones ensayadas concuerda con lo observado en el análisis de la celulosa del RSI, donde se podía apreciar como apenas se producía solubilización de este componente en la fracción líquida tras el pretratamiento. De esta manera, ambos rendimientos son bastante parecidos a 160 y 180° C y sólo a partir de 200 °C, donde se produce un descenso del rendimiento de recuperación de celulosa en el RSI, se aprecian mayores diferencias entre ellos.

#### 4.2.1.1.5 Rendimiento global de azúcares

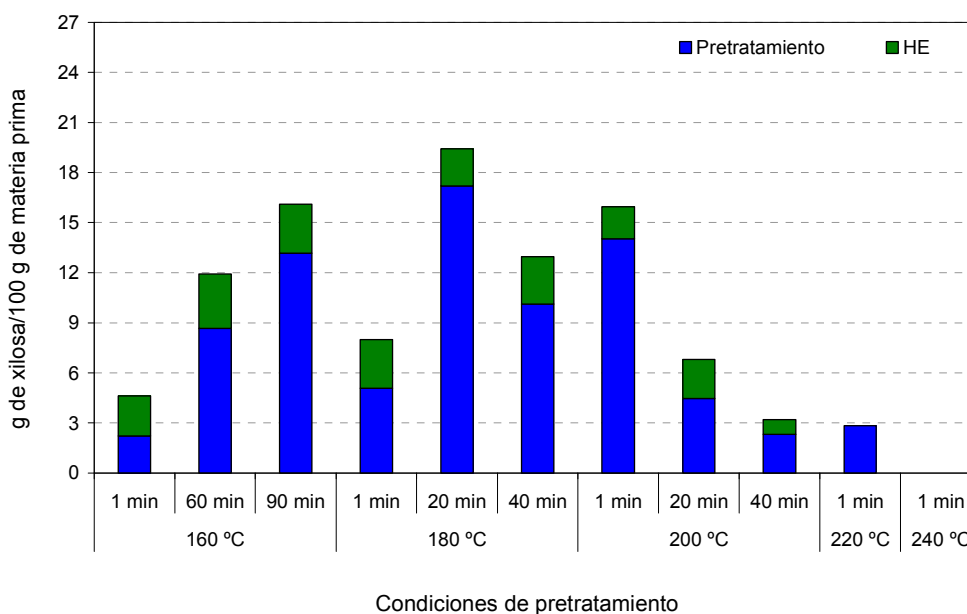
Un pretratamiento es más eficiente cuanto mayor es el rendimiento global de azúcares fermentables, que incluye la liberación y recuperación de azúcares en las etapas de hidrólisis y pretratamiento. Los azúcares obtenidos en forma monomérica, como consecuencia de la acción del pretratamiento y la hidrólisis enzimática, son susceptibles de ser fermentados a etanol, y por lo tanto, evitar que se produzcan las mínimas pérdidas de éstos resulta una tarea indispensable para obtener los mayores rendimientos de proceso posibles.

El cálculo del rendimiento global de azúcares se ha centrado en la glucosa y la xilosa, teniendo en cuenta que la xilosa constituye más del 90% de los azúcares hemicelulósicos. En lo que se refiere al rendimiento global de glucosa, Figura 50, en la mayoría de las condiciones experimentales se obtuvieron valores entre 30-35 g/100 g materia prima, lo cual representa un 70-80% de la glucosa potencial del sustrato. De este porcentaje, la mayoría de la glucosa procede de la liberada durante la etapa de hidrólisis enzimática, ya que durante el pretratamiento, menos del 4% de la glucosa contenida en la materia prima, es solubilizada en la fracción líquida. A partir de los datos mostrados en la gráfica, y como análisis preliminar del comportamiento de la paja de trigo en un tratamiento por ACL, se puede inferir que para alcanzar máximos rendimientos globales de glucosa se podrían emplear dos condiciones experimentales diferentes: bajas temperaturas (160 °C) y largos tiempos de residencia (90 min), o altas temperaturas (220 °C) y tiempos de residencia cortos.



**Figura 50. Rendimiento global de glucosa (expresada en g glucosa/100 g de materia prima) obtenida tras el pretratamiento y la hidrólisis enzimática sobre paja de trigo pretratada a diferentes condiciones de proceso**

Los valores del rendimiento global de xilosa, Figura 51, siguieron un patrón similar a la variación de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida, debido a la poca cantidad de xilosa liberada en la etapa de hidrólisis enzimática. El valor más alto de rendimiento (18 g/100 g de materia prima, correspondiente a un 70% respecto al contenido en materia prima) se obtuvo a 180 °C de temperatura y 20 min de residencia en el reactor.



**Figura 51. Rendimiento global de xilosa (expresada en g xilosa/100 g de materia prima) obtenida tras el pretratamiento y la hidrólisis enzimática sobre paja de trigo pretratada a diferentes condiciones de proceso**

A partir de este primer estudio del comportamiento de la paja de trigo al someterla al PACL, se estableció como intervalo experimental de temperatura para los posteriores estudios de optimización de 170 y 220 °C, en base al objetivo de obtener el mayor rendimiento global de azúcares fermentables a etanol. En cuanto al tiempo, se comprobó que el valor de tiempo 1 min era demasiado corto en comparación con el tiempo necesario para alcanzar la temperatura requerida en el interior del reactor, el cual a partir de ahora se estableció en 0 min, considerando este el tiempo requerido para alcanzar la temperatura de trabajo. Como límite máximo se estableció 40 min, ya que valores superiores de tiempo de residencia no serían adecuados para el rango de temperatura establecido.

Otra de las decisiones a adoptar para la continuidad de la investigación fue la selección de las variables de estudio que se van a considerar como eje principal de la optimización del pretratamiento con agua caliente líquida de la paja de trigo. En este sentido, puesto que la glucosa y los azúcares hemicelulósicos (xilosa) son los dos componentes potencialmente

convertibles a etanol, se consideró que las variables que rigen su comportamiento a lo largo de todo el proceso serían las principales a optimizar. En un principio, se podría considerar como variable más representativa el “rendimiento global de azúcares” después de las etapas de pretratamiento e hidrólisis, pero habría que tener en cuenta el error introducido como consecuencia de los múltiples cálculos realizados hasta la obtención de dicho valor. Esta variable hace uso del porcentaje de recuperación de sólidos para expresarse en función del contenido del azúcar en la materia prima, con el consiguiente error que esta medida conlleva. Además, en el caso de la glucosa, la cantidad originada en la etapa de HE (en las óptimas condiciones) es mucho mayor que la solubilizada en la fracción líquida durante la etapa de pretratamiento. El caso de la xilosa es similar, la cantidad de este azúcar que se libera durante la etapa de HE (en las condiciones experimentales óptimas de liberación de glucosa) es muy baja respecto a la encontrada en la fracción líquida. En consecuencia, la suma de estas pequeñas cantidades, tanto en la glucosa como en la xilosa, resulta en un aumento de la variabilidad del valor final de la variable respuesta.

Por lo tanto, en la búsqueda de las condiciones óptimas de pretratamiento de la paja de trigo mediante ACL para la obtención de azúcares potencialmente fermentables a etanol, se va a considerar la “eficacia de sacarificación” y la “recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida” como variables objeto de optimización.

#### 4.2.1.2 Estudio del efecto de las variables de proceso en el pretratamiento por ACL de la paja de trigo

En esta etapa de la investigación se pretende conocer cómo afectan una serie de variables del proceso de pretratamiento (factores), en cuanto a su efectividad para promover la liberación de azúcares de la materia prima objeto de este trabajo. Además de la temperatura y el tiempo de residencia, cuyos rangos de experimentación fueron seleccionados en el apartado anterior, se consideraron la carga de sustrato y sobrepresión añadida en el reactor como variables a evaluar en cuanto a su efecto en el pretratamiento.

Para la valoración tanto cualitativa como cuantitativa del efecto de estos factores se empleó la metodología del DEE, concretamente un diseño factorial completo  $2^4$ , especialmente indicado cuando se pretende realizar un cribado de los factores que afectan a un determinado proceso, en función del efecto que producen sobre una determinada respuesta. La metodología de DEE resulta muy útil frente al método tradicional de variar un factor-cada-vez, que no suele ser la mejor opción, ya que implica más experimentos de los necesarios y, a pesar de ello, proporciona sólo información parcial. Por ejemplo, no mostrará si existe interacción entre factores. Las interacciones suelen ser muy corrientes y a veces son los efectos más importantes, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender el comportamiento de muchos

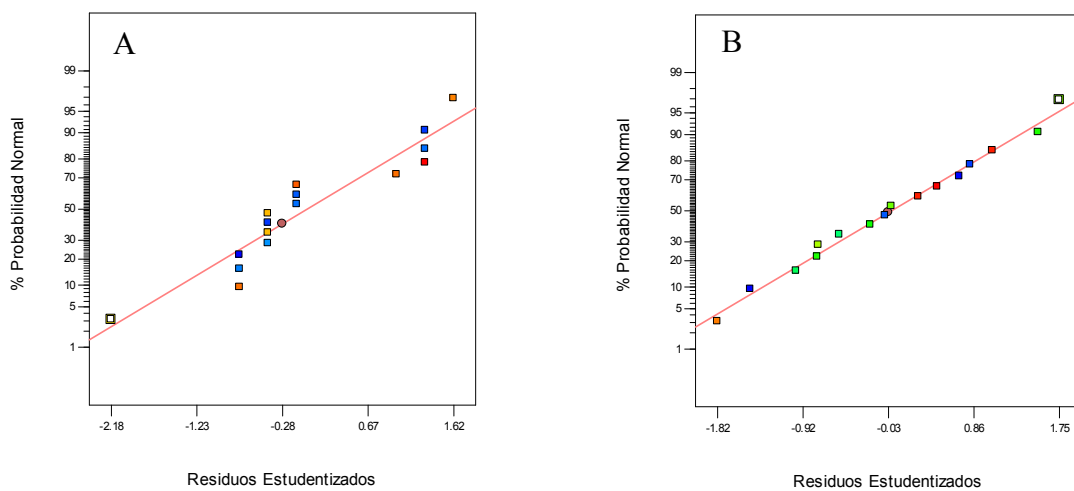
sistemas (Montgomery, 2004). En la Tabla 7 se muestran los valores de la composición del RSI, la susceptibilidad del RSI al ataque enzimático y la recuperación de azúcares en la fracción líquida en las distintas condiciones de pretratamiento establecidas mediante el diseño de experimentos empleado (Diseño 1). Los resultados correspondientes a la composición en celulosa, xilanos y grupos acetilo del RSI, la RAH en la fracción líquida y la ES del RSI mostrados en la Tabla 7, se analizaron mediante el análisis de superficie respuesta.

Tabla 7. Recuperación de sólidos, composición del RSI, recuperación de azúcares hemicelulósicos (en porcentaje del contenido de azúcar en la materia prima) y valores de pH de la fracción líquida, e índices de hidrólisis enzimática del RSI (ES, en g glucosa/100 g glucosa potencial en RSI y RHE, en g glucosa/100 g glucosa potencial en materia prima), obtenidos tras el pretratamiento de la paja de trigo (Diseño 1)

Experiencias (Diseño I)				Recuperación de Sólidos		Composición RSI (% bps)					Fracción Líquida		Índices de hidrólisis enzimática	
°C	min	bar	% (p/v)	(g /100 g materia prima)		Celulosa	Xilano	Acetilos	Lignina	% RAH	pH	% ES	% RHE	
170	0	0	5		83,0	50,0	25,4	1,5	21,2	10,0	5,3	22,1	21,8	
200	0	0	5		74,6	55,8	15,2	0,8	22,7	52,7	4,4	69,8	69,4	
170	40	0	5		69,6	58,5	16,0	1,0	23,8	43,4	4,4	47,9	46,5	
200	40	0	5		58,2	63,3	0,3	0,2	25,1	5,4	3,6	95,8	84,2	
170	0	30	5		89,6	45,5	23,8	1,4	20,8	6,9	5,4	24,3	23,6	
200	0	30	5		73,0	53,6	15,0	0,7	22,6	47,2	4,7	65,1	60,8	
170	40	30	5		66,5	62,4	14,7	0,4	24,9	47,1	4,5	57,8	57,1	
200	40	30	5		57,5	64,5	2,6	0,2	25,4	7,6	3,8	93,6	82,8	
170	0	0	10		88,2	47,0	23,9	1,5	20,1	9,3	5,3	17,5	17,3	
200	0	0	10		73,1	56,9	15,9	0,9	24,8	48,1	4,5	58,9	58,4	
170	40	0	10		76,3	54,9	16,8	0,9	25,3	46,6	4,4	49,9	49,8	
200	40	0	10		62,6	63,2	2,2	0,2	24,8	2,2	3,7	93,6	88,4	
170	0	30	10		83,8	46,1	23,1	1,5	21,5	7,9	5,3	17,7	16,3	
200	0	30	10		69,3	57,9	15,2	1,0	23,9	43,8	4,6	58,9	56,3	
170	40	30	10		69,9	56,1	15,2	0,8	24,4	41,4	4,4	66,6	62,2	
200	40	30	10		60,0	64,9	2,2	0,2	25,4	4,6	3,6	86,1	79,9	

#### 4.2.1.2.1 Ajuste del modelo

Cuando la metodología del DEE es utilizada con el fin de conocer un determinado proceso, el primero de los pasos es evaluar si el modelo matemático utilizado se ajusta adecuadamente a los datos experimentales obtenidos, y comprobar que la información que ofrece es lo más fiable posible. Para ello, y como herramienta más representativa para este fin, se usa la gráfica de probabilidad normal frente a los residuos. En la Figura 52 se representa el gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados para los parámetros RAH en la fracción líquida (A) y la eficacia de sacarificación del RSI (B).



**Figura 52. Gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados para la RAH en la fracción líquida, (A), y ES del RSI, (B)**

En estas gráficas se puede apreciar cómo el análisis probabilístico de los residuos se ajusta a una línea recta, lo cual permite concluir que las interpretaciones realizadas en base al peso de los efectos de los factores en la región experimental, y en base a las interacciones que pudieran existir entre los mismos, son correctas. Esta comprobación sobre la calidad del modelo utilizado ha sido realizada en cada una de las variables respuesta analizadas en esta etapa del trabajo, siendo satisfactoria en todos los casos. Por lo tanto, se ha considerado redundante incluirlo en la discusión de los resultados, sirviendo el análisis de la primera respuesta como base para todas.



#### 4.2.1.2.2 Composición del RSI

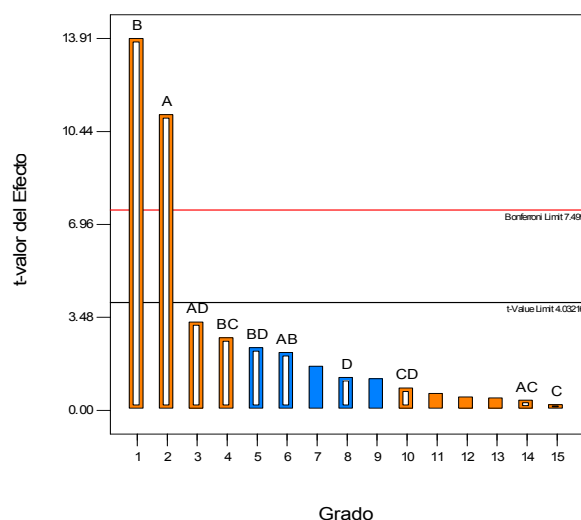
El RSI se caracterizó en cuanto a su composición en celulosa, hemicelulosa (xilano), lignina y grupos acetilo. En cuanto a los resultados del contenido en celulosa del RSI en las distintas condiciones de pretratamiento, se observa que el PACL, en todas las condiciones ensayadas, conduce a un incremento en el porcentaje de celulosa de la fracción sólida (valores entre 45 y 65%) en comparación con la biomasa sin pretratar (37,8%). Esto es debido principalmente a una creciente solubilización de algunos componentes de la materia prima, tales como extractivos, azúcares hemicelulósicos y cenizas solubles.

Por otra parte, los valores de recuperación de celulosa, referido al contenido en materia prima, representan un importante indicador de las posibles pérdidas por solubilización de este componente durante el pretratamiento. Para el cálculo de estos valores, el primer paso fue la determinación del porcentaje de recuperación de sólidos (% RS). Esta variable es calculada como el peso seco de RSI que se obtiene después del pretratamiento en referencia a 100 g de materia prima. Como se observa en Tabla 7, los valores de % RS se encontraron entre el 57,5 y el 90%, dependiendo de las condiciones del pretratamiento. Las recuperaciones más bajas fueron obtenidas a 200 °C y 40 min, independientemente del valor que tomaran la sobrepresión en el reactor y la carga de sustrato. Como era de esperar, el incremento de la temperatura y el tiempo dio lugar a un menor porcentaje de recuperación, debido a una mayor solubilización de los componentes no estructurales, y a las pérdidas ocasionadas por la volatilización de compuestos (Mok y Antal, 1992).

Los valores de recuperación de celulosa en el RSI fluctúan entre el 88 y el 99%, indicando una baja solubilización de este componente a lo largo de las condiciones experimentales ensayadas. Estos datos ponen de manifiesto que la fracción de celulosa de la biomasa de paja de trigo no se ve afectada prácticamente por el PACL, condición indispensable en un pretratamiento eficaz. Garrote y *col.* (2001) obtuvieron valores similares de recuperación de glucosa durante el pretratamiento de mazorca de maíz con ACL.

En cuanto a la significación estadística del efecto que las distintas variables de proceso ejercen en la composición en celulosa del RSI, en la Figura 53 se muestra el gráfico de Pareto del peso estadístico de los factores estudiados sobre esta variable. Este gráfico ofrece un histograma de frecuencia donde la longitud de cada barra es proporcional al valor total de su efecto. La línea horizontal muestra el nivel de significación estadística, quedando por encima del mismo, sólo el tiempo y la temperatura. A partir de la gráfica se puede concluir, por tanto, que los factores que tienen una influencia significativa son el tiempo y la temperatura. El método formal para respaldar estas afirmaciones es el uso del análisis de la varianza (Anexo I), en el cual se observan los *P-valores* asignados a cada una de los factores que intervienen en el modelo. La temperatura y el tiempo tienen un *P-valor* por debajo del nivel de significación

estadístico establecido, que en este caso es 0,05, lo que confirma que su efecto es significativo. Por el contrario, la variación de la carga de sustrato en el reactor y la aplicación o no de sobrepresión, no presentan significación estadística.

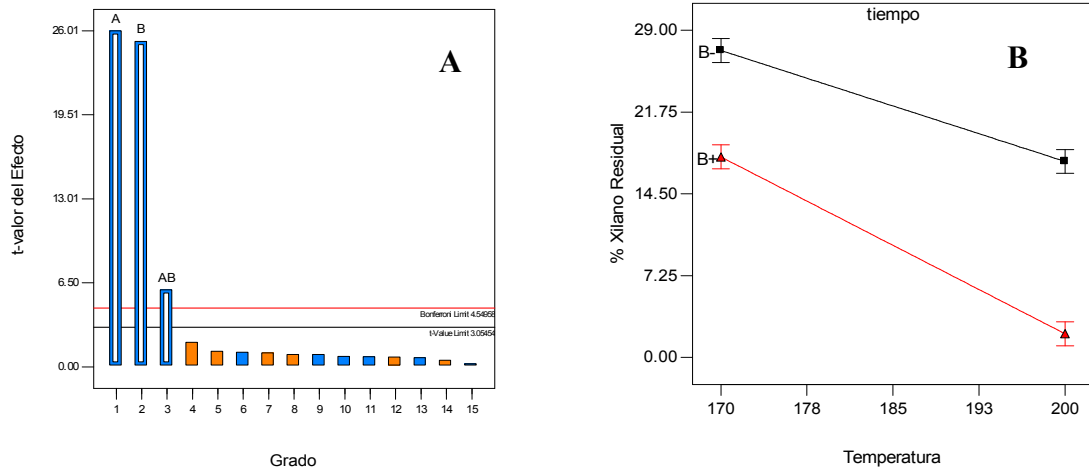


**Figura 53. Gráfico de Pareto correspondiente al porcentaje de celulosa en el RSI. A: Temperatura, B: Tiempo, C: Carga de Sustrato, D: Sobrepresión**

En la Tabla 7 se muestra la composición en xilano del RSI, ya que la xilosa fue el único azúcar hemicelulósico encontrado en dicha fracción. Como era de esperar, un incremento en los valores de temperatura y tiempo producen una mayor solubilización de este componente hemicelulósico. En las condiciones más severas, 200 °C y 40 min, el contenido de xilano en el RSI desciende hasta valores de 0,3-2,2% bps. Si este valor es referido al contenido en xilano de la materia prima, teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación de sólidos, significa que menos de 6% del contenido inicial de xilano permanece en el RSI después del pretratamiento a estas condiciones. Como se ha descrito en el apartado 1.3.4.3, las cadenas de xilanos presentes en la materia prima se encuentran, junto con la lignina, rodeando a las de celulosa, dificultando el acceso de las enzimas celulolíticas. Por lo tanto, y con el objetivo de aumentar los rendimientos de sacarificación enzimática, la extracción de este componente de la materia prima constituye un importante objetivo del pretratamiento.

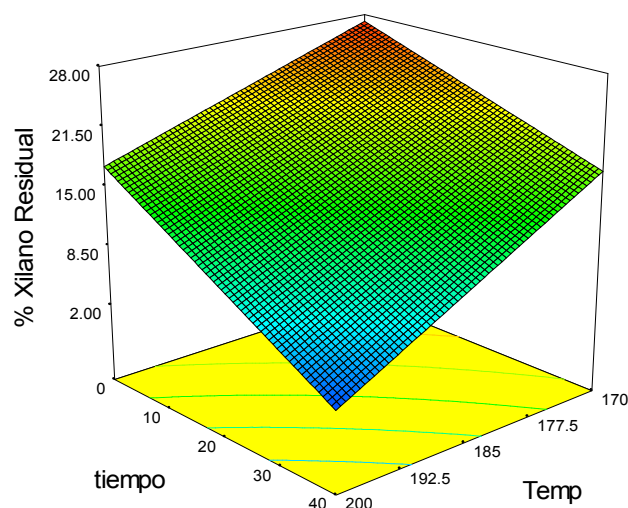
El análisis del gráfico de Pareto del contenido en xilano del RSI, Figura 54A, ilustra como la interacción entre la temperatura y el tiempo tienen una influencia significativa sobre esta variable. La sobrepresión añadida y la carga de sustrato utilizada se encuentran por debajo del nivel de significación estadística. Estas afirmaciones vienen fundamentadas en el análisis de la Tabla Anova (Anexo I) correspondiente al porcentaje de xilano residual en el RSI, donde se puede observar cómo los factores temperatura y tiempo y la interacción entre ambos, presentan

un p-valor inferior a 0,0001. En la Figura 54B se muestra la influencia que la interacción entre los dos factores ejerce sobre la cantidad de xilano residual del RSI. Se observa como el incremento del tiempo de 0 a 40 min a 200 °C, da lugar a un mayor descenso en la respuesta que el producido a 170 °C.



**Figura 54. Gráfico de Pareto (A) y gráfica de interacción (B) para el porcentaje de xilano residual en el RSI. Siendo t+ el nivel alto del tiempo (40 min) y t- el nivel bajo del tiempo (0 min)**

La evolución de esta variable a lo largo de las distintas condiciones experimentales ensayadas viene representada en la gráfica de superficie respuesta de la Figura 55. Este gráfico ilustra la evolución de la concentración de xilano en el RSI que se puede apreciar a partir de los datos de la Tabla 7, indicando una clara tendencia a decrecer a medida que aumenta la severidad del pretratamiento.

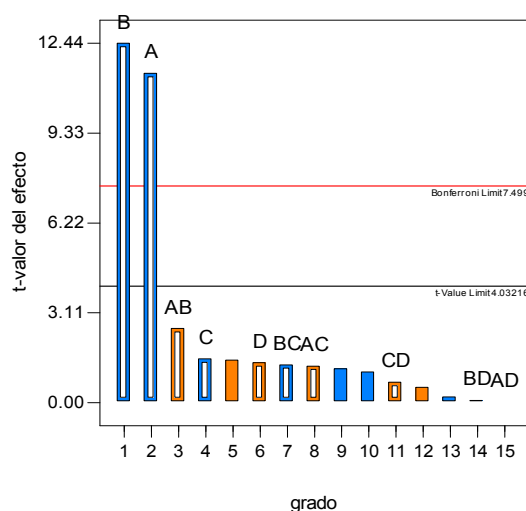


**Figura 55. Superficie respuesta para el contenido en xilano del RSI (expresado como g xilano/100 g de RSI). Carga de sustrato y sobrepresión ajustadas a valores centrales [7.5% (p/v) y 15 bares, respectivamente].**

El contenido en xilano y grupos acetilos del RSI son dos variables íntimamente ligadas, ya que los grupos acetilos se encuentran formando parte de la cadena principal de xilanos que constituyen el componente hemicelulósico en la paja de trigo. Observando los datos en base a una misma carga de sustrato y la aplicación o no de sobrepresión, (experimentos 1-4, 5-8, 9-12, 13-16) se puede apreciar un descenso pronunciado en ambas respuestas a medida que aumenta la temperatura y tiempo de residencia, independientemente de los valores que tomen los demás factores. A 170 °C y tiempo 0 min, la mayoría de los grupos acetilo, el 1,5% bps (99% de los grupos acetilos en la materia prima), permanecen en el RSI, mientras que un incremento en el tiempo de residencia a 40 min, a la misma temperatura, produce un descenso en el contenido de grupos acetilo hasta aproximadamente la mitad de su valor (<0,4-1% bps). A 200 °C se produce un efecto similar, los valores caen desde el 0,7-1% bps a tiempo 0, hasta aproximadamente un 0,2% bps a 40 min, es decir, desde un 40-50% hasta un 8% del contenido en grupos acetilos de la materia prima, respectivamente. El análisis de correlación de los valores del contenido en xilano y grupos acetilos del RSI, mostró una correlación lineal entre ambos parámetros ( $R^2$  ajustado = 0,977).

El incremento de la temperatura tiene un efecto similar al del tiempo sobre el contenido en grupos acetilos del RSI. Comparando las distintas condiciones experimentales realizadas a 170 °C y 0 min, con las realizadas a 200 °C y 0 min, se observa un descenso de los valores del contenido en grupos acetilo del RSI desde el 1,5% bps hasta el 0,8% bps (desde el 95% hasta el 45% del contenido en materia prima, respectivamente). Esta comparación del efecto del tiempo y temperatura puede realizarse teniendo en cuenta que no existe una interacción significativa entre ambos factores, en cuanto al contenido de acetilos en el RSI. El análisis del gráfico de

Pareto para esta variable (Figura 56) ilustra como la temperatura y el tiempo ejercen, de manera independiente, una influencia significativa sobre la variación de los grupos acetilos en el RSI.



**Figura 56. Gráfico de Pareto para el contenido en grupos acetilos del RSI. A: Temperatura, B: Tiempo, C: Carga de Sustrato, D: Sobrepresión**

El hecho de que el incremento en los valores de temperatura y tiempo de residencia provoque la progresiva liberación, tanto de los grupos acetilos como de los xilanos de la materia prima durante la etapa de pretratamiento, tiene su base en el aumento del efecto hidrolítico del agua, el cual se hace mayor a medida que aumentamos la severidad del proceso. El  $pK_a$  del agua, y por tanto su fortaleza como ácido, es afectado por la temperatura, ya que el pH del agua pura a 200 °C es cercano a 5.0 (Allen y *col.*, 2001), comparado con el 7,0 a 25 °C. El agua tiene una inusualmente alta constante dieléctrica la cual es capaz de ionizar sustancias, y por consiguiente, disociarlas. Este efecto hidrolítico del agua es el desencadenante de la rotura del enlace éster que unen los grupos acetilos a las hemicelulosas, (descrito en el apartado 1.5.6) provocando la solubilización de estos en la fracción líquida y dando lugar al ácido acético. Simultáneamente, el efecto disociador del agua combinado con la acidificación del medio por la presencia de ácido acético en disolución, provoca un entorno progresivamente ácido en el que se ve favorecida la hidrólisis de hemicelulosas (Bouchard y *col.*, 1990), así como la desestabilización estructural de la lignina (Li y *col.*, 2007). No obstante, estas mismas condiciones se pueden llegar a producir reacciones de degradación molecular que generen compuestos de bajo peso molecular como furfural e hidroximetilfurfural (Garrote y *col.*, 2001), que a su vez se degradan en ácido fórmico y ácido levulínico (Klinke y *col.*, 2004). La formación de estos compuestos es un aspecto no deseable, ya que pueden producir un efecto inhibitor sobre los microorganismos encargados de realizar la fermentación de los azúcares a etanol. En el apartado siguiente se discuten los valores

encontrados de estos compuestos en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento en las distintas condiciones experimentales.

En la Tabla 7 también se muestran los resultados experimentales obtenidos en referencia a la evolución del componente lignina a lo largo del proceso de pretratamiento. En todas las condiciones experimentales realizadas, este componente se encontró considerablemente concentrado en comparación con el contenido en la materia prima (16.3% bps), alcanzando valores de 20 al 25,4% bps. Si estos valores se refieren al contenido de lignina en la materia prima teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación de sólidos, se puede observar que los valores de lignina se encuentran por encima del contenido inicial del 16.3% bps, en la mayoría de las condiciones ensayadas. Este fenómeno puede ser debido a reacciones de condensación de lignina en el sustrato durante el pretratamiento, ya descritas en experiencias de pretratamiento con explosión a vapor de paja de trigo y bagazo de sorgo (Ballesteros y *col.*, 2004), y de PACL en bagazo de maíz (Liu y Wyman, 2005).

#### *4.2.1.2.3 Análisis de la fracción líquida*

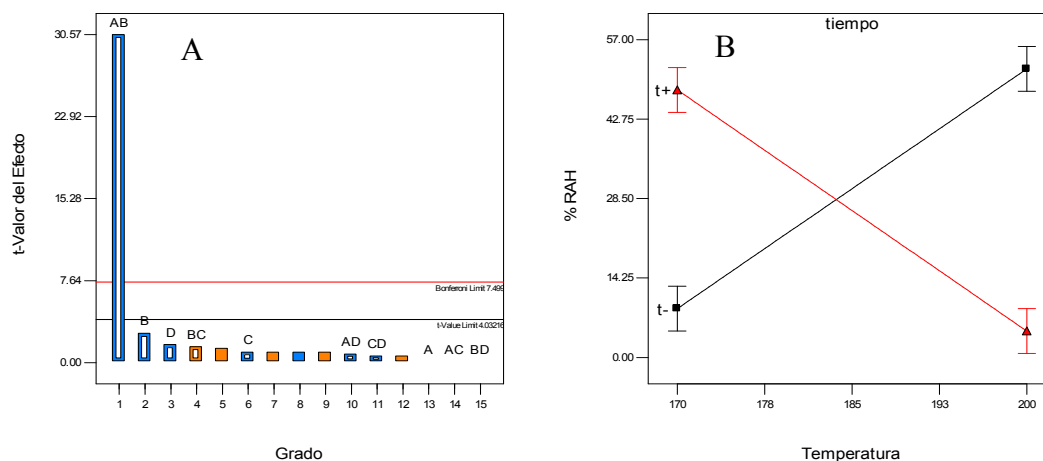
Para la evaluación del efecto de los distintos factores de proceso sobre las variaciones en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de la paja de trigo, se han analizado la recuperación de azúcares hemicelulósicos (RAH) y la concentración de inhibidores generados durante el proceso. Se han considerado compuestos inhibidores los ácidos fórmico, acético y levulínico, y los furanos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Los resultados experimentales obtenidos para la variable RAH en la fracción líquida se muestran en la Tabla 7. Dichos valores están expresados como porcentaje del contenido en la materia prima, y corresponden a los azúcares encontrados después de someter a la fracción líquida a una post-hidrólisis suave, es decir a los azúcares tanto en forma de oligómeros, como de monómeros. En todos los experimentos los oligómeros comprenden más del 95% del total de los azúcares. Esta solubilización del xilano mayoritariamente en forma oligomérica ha sido descrita en el PACL de otros residuos agrícolas, tales como el bagazo de maíz (Liu y Wyman, 2003). Ésta es una de las principales diferencias respecto a la utilización de agentes ácidos en el pretratamiento, donde los azúcares en forma monomérica constituyen la fracción mayoritaria de los azúcares de la fracción líquida (Saha y *col.*, 2005; Dien y *col.*, 2006).

Los valores de RAH en la Tabla 7 se refieren a la recuperación de todos los azúcares hemicelulósicos; xilosa, arabinosa y galactosa, si bien la xilosa es el principal constituyente (70-90%) del total de azúcares hemicelulósicos encontrados en la fracción líquida. Los datos indican que la RAH es altamente dependiente de la temperatura y el tiempo de residencia, produciendo cambios significativos desde valores bajos del 10% a 170 °C y 0 min hasta 48% a 200 °C e igual tiempo. El gráfico de Pareto (Figura 57A) muestra como solo estos dos factores tienen efecto

significativo sobre la respuesta estudiada, quedando fuera del nivel de significación la carga de sustrato y la sobrepresión aplicada en el reactor, dentro del intervalo estudiado. No obstante, la respuesta al incremento de tiempo de 0 a 40 min no es igual cuando el pretratamiento se realiza a bajas o elevadas temperaturas, por lo que en este punto es muy útil recurrir al análisis de la interacción entre factores. En la Figura 14A se observa como la interacción existente entre la temperatura del proceso y el tiempo de residencia se encuentra por encima del nivel de significación estadístico (línea negra), obteniéndose un p-valor muy por debajo del nivel de significación establecido (0,05) (Anexo I). Que exista una interacción implica que el efecto que el factor temperatura ejerza sobre la RAH en la fracción líquida dependerá de los niveles que presente el factor tiempo, y viceversa. Al existir una interacción significativa entre factores, no se puede interpretar individualmente el valor de cada efecto principal, sino que deben compararse los cambios que los distintos niveles de los factores implicados producen sobre la variable respuesta medida.

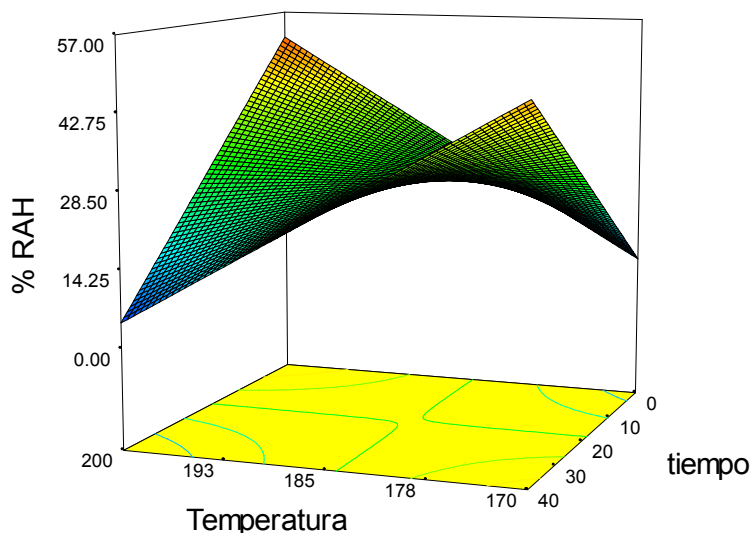
En el gráfico de interacción (Figura 57B), se puede ver como el aumento de 0 a 40 min a 170 °C implica un incremento en el valor de la RAH en la fracción líquida. Por el contrario, a 200 °C, pasar de 0 a 40 min conlleva una reducción considerable de la recuperación de azúcares hemicelulósicos. Igualmente, el aumento de 170 a 200 °C implica un cambio de tendencia opuesta en la RAH en función del tiempo de residencia.



**Figura 57. Gráfico de Pareto (A) y gráfica de interacción (B) para la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida. Siendo t+ el nivel alto del tiempo (40 min) y t- el nivel bajo del tiempo (0 min)**

Así mismo, en la Figura 58 se observa como a consecuencia de la interacción existente entre los factores estudiados, dentro de la región experimental estudiada, se produce una curvatura de la superficie respuesta, dando lugar a dos regiones diferenciadas donde podría encontrarse un valor óptimo de recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida,

una a bajas temperaturas y altos tiempos de residencia, y otra a altas temperaturas y bajos tiempos de reacción. No obstante, esta afirmación debe ser corroborada mediante un estudio de optimización de dicha variable respuesta.



**Figura 58. Superficie respuesta para la recuperación de los azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida en relación a su contenido en la materia prima. Carga de sustrato y sobrepresión ajustadas a valores centrales [7.5% (p/v) y 15 bares, respectivamente].**

La significación estadística simultánea de los factores temperatura y tiempo se puede apreciar también a partir del análisis de los datos experimentales mostrados en la Tabla 7. Al comparar las condiciones experimentales entre 170 y 200 °C realizadas a tiempo 0 min (independientemente del valor tomado por la sobrepresión y la carga de sustrato) se observa como los rendimientos de RAH ascienden desde 6,9-10% a 43,8-52,7%, respectivamente. Por el contrario, un incremento del tiempo de residencia (40 min) a las mismas temperaturas produce un descenso en los valores de RAH de 41,4-47,1% hasta 2,2-7,6%, respectivamente. Consecuentemente con la interacción descrita, para el factor tiempo se observa un patrón similar. Pasar de 0 a 40 min a la temperatura de 170 °C, produce un ascenso del rendimiento de RAH en la fracción líquida desde 6,9-10% hasta 41,4-47,1%. Por el contrario, el mismo incremento del tiempo a 200 °C da lugar a un descenso en los valores de recuperación desde el 43,8-52,7% hasta 2,2-7,6%. El máximo rendimiento, cercano al 53%, es del orden del obtenido en otros materiales lignocelulósicos pretratados mediante ACL. (Sreenath y *col.*, 1999) obtuvieron un prehidrolizado con un contenido en azúcares hemicelulósicos del 50% después de tratar la fibra de alfalfa a 220 °C y 2 min. Negro y *col.* (2003a), en las mejores condiciones, consiguieron un



60% de recuperación de azúcares hemicelulósicos al pretratar madera de chopo mediante ACL a 210 °C.

En la solubilización de los azúcares hemicelulósicos de la materia prima existe una limitación físico-química intrínseca a la fortaleza del agente disociador presente en los procesos de autohidrólisis, como son, principalmente, el agua y ácido acético ( $pK = 4,74$ ) (Weil y *col.*, 1998). La capacidad disociativa de estos compuestos no proporciona la suficiente acidez en el medio de reacción como para provocar la alteración estructural de aquellas zonas más polimerizadas de la materia prima donde se encuentran una cantidad importante de polímeros hemicelulósicos, limitando por tanto los rendimientos de recuperación de estos azúcares. Esta hipótesis está apoyada por resultados publicados en la bibliografía sobre la utilización de compuestos con una mayor capacidad hidrolítica en el pretratamiento, como el ácido sulfúrico ( $pK=1,92$ ), que muestran la posibilidad de alcanzar valores más elevados de RAH. Por ejemplo, Saha y *col.* (2005) y Aguilar y *col.* (2002), al pretratar la paja de trigo y el bagazo de caña de azúcar, respectivamente, con ácido sulfúrico diluido, obtienen valores de RAH de 75-85% del contenido en materia prima, lo que supone un incremento sustancial respecto a los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo.

Por otra parte, los cambios ocurridos en el rendimiento de recuperación de azúcares hemicelulósicos están muy relacionados con las variaciones de los valores de pH de la fracción líquida (Tabla 7), los cuales disminuyen a medida que las condiciones experimentales de tiempo y temperatura se hacen más severas. A su vez, este hecho es consistente con la tendencia creciente de liberación de grupos acetilo de la fracción sólida con el aumento del tiempo y la temperatura, y consecuentemente, con la aparición de ácido acético en la fracción líquida. El incremento de tiempo de residencia en el reactor a temperaturas elevadas conduce a valores de pH de alrededor de 3,5, que dan lugar a fenómenos de degradación de los azúcares solubilizados, disminuyendo por tanto el rendimiento de recuperación. En la Tabla 8 se muestra el rendimiento de producción de ácido acético y productos de degradación en la fracción líquida en las distintas condiciones de pretratamiento. Se observa como a las condiciones más severas de tiempo y temperatura se encuentran los mayores rendimientos de compuestos de degradación de azúcares, principalmente furfural y ácido fórmico. La cantidad de ácido levulínico encontrada fue despreciable y los valores de HMF encontrados siempre fueron  $<0,5$  g/100 g materia prima. El rendimiento de productos inhibidores mostrado en la Tabla 8 resulta en concentraciones en la fracción líquida del orden de 2 g/l y 3,3 g/l para acético y furfural, en las condiciones más severas, respectivamente. En base a los estudios aportados en la literatura sobre el efecto inhibitorio de estos compuestos (García-Aparicio y *col.*, 2006; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000), se podría predecir que a las concentraciones encontradas, la presencia de estos compuestos no inhibirían una posible fermentación a etanol de esta fracción (Klinke y *col.*, 2001), si bien este extremo habría que confirmarlo.

**Tabla 8. Rendimientos de ácido acético y compuestos de degradación (g/100 g de materia prima) obtenidos en la fracción líquida tras el PACL de la paja de trigo (Diseño 1)**

<i>Experiencias</i>				<i>Fracción Líquida</i>			
°C	min	bar	% (p/v)	Ácido Fórmico	Ácido Acético	5-HMF	Furfural
170	0	0	5	0	0,83	<0,1	<0,1
200	0	0	5	0,32	1,73	<0,1	0,26
170	40	0	5	0,33	1,03	<0,1	0,18
200	40	0	5	0,82	1,89	0,40	2,72
170	0	30	5	0	0,63	<0,1	<0,1
200	0	30	5	0,26	0,89	<0,1	0,08
170	40	30	5	0,33	1,07	<0,1	0,28
200	40	30	5	0,26	1,75	0,40	2,39
170	0	0	10	0,20	0,88	<0,1	<0,1
200	0	0	10	0,20	0,99	<0,1	0,11
170	40	0	10	0,78	0,70	<0,1	0,15
200	40	0	10	0,11	1,99	0,50	3,32
170	0	30	10	0,23	0,51	<0,1	<0,1
200	0	30	10	0,27	1,03	<0,1	0,18
170	40	30	10	0,34	1,68	<0,1	0,22
200	40	30	10	1,03	1,77	0,50	2,22

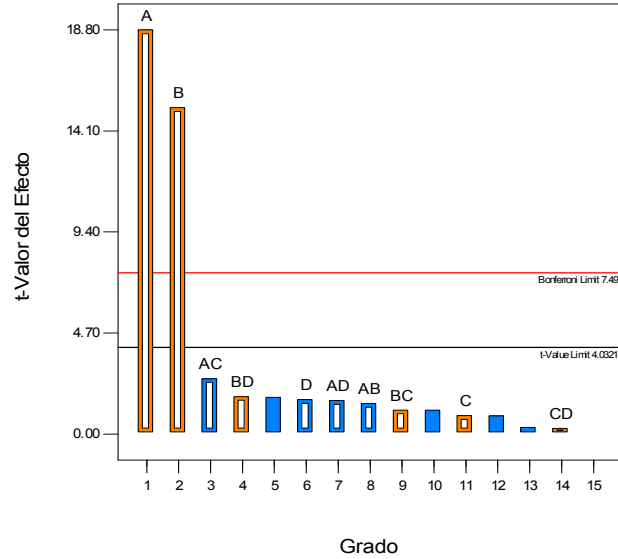
#### 4.2.1.2.4 Digestibilidad enzimática del RSI

La alteración estructural de la celulosa contenida en el material pretratado como consecuencia del efecto del pretratamiento, repercutirá directamente sobre la digestibilidad enzimática de ésta, y por tanto, sobre la liberación de azúcares a partir del RSI. Con el objetivo de cuantificar la eficacia con la que las enzimas acceden a la celulosa se estudian dos variables; la eficacia de sacarificación (ES), calculada sobre la celulosa contenida en el RSI, y el rendimiento en HE (RHE), calculado sobre el contenido en celulosa de la materia prima.

Los resultados obtenidos experimentalmente para la ES se muestran en la Tabla 7. La digestibilidad enzimática del RSI aumenta significativamente cuando se incrementa el tiempo de residencia (de 0 a 40 min), para las dos temperaturas ensayadas. Del mismo modo, el incremento de la temperatura desde 170 hasta 200 °C, da lugar a un aumento en los porcentajes de la ES desde un 17,5 hasta un 69% al nivel bajo (0 min) del factor tiempo, y desde un 48 al 95% a nivel alto (40 min). Así mismo, cuando la ES se expresa en base al contenido en celulosa de la materia prima (RHE) los valores siguen un patrón similar, reflejando las escasas pérdidas de celulosa ocurridas durante el pretratamiento ya observadas anteriormente.

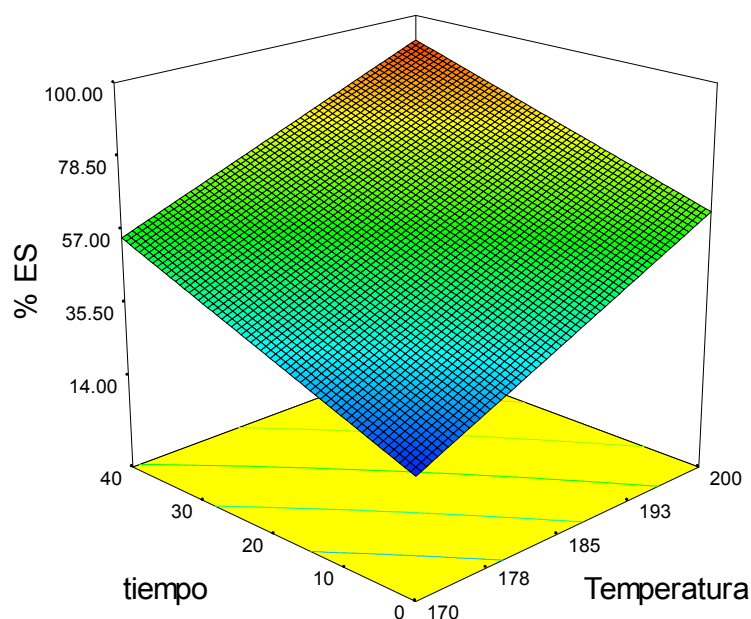
Del análisis de la varianza (Anexo I), que muestra los p-valores asignados por el modelo a los distintos factores estudiados, y del gráfico de Pareto representado en la Figura 59, se

deduce que la temperatura y el tiempo de residencia ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ) tienen un efecto significativo sobre la variación de los porcentajes de la ES, dentro del intervalo estudiado, mientras que la carga de sustrato y la sobrepresión añadida en el reactor se encuentran fuera del límite de significación.



**Figura 59. Gráfico de Pareto correspondiente a la eficacia de sacarificación obtenida sobre los distintos RSI. A: Temperatura, B: Tiempo, C: Carga de Sustrato, D: Sobrepresión**

El efecto que la temperatura y el tiempo de residencia producen sobre los valores de ES se ilustra en el gráfico de superficie respuesta (Figura 60). En esta figura se observa cómo, al no existir interacción entre ambos factores, a medida que se aumentan los valores de la temperatura y tiempo de residencia, se producen mayores porcentajes de ES.



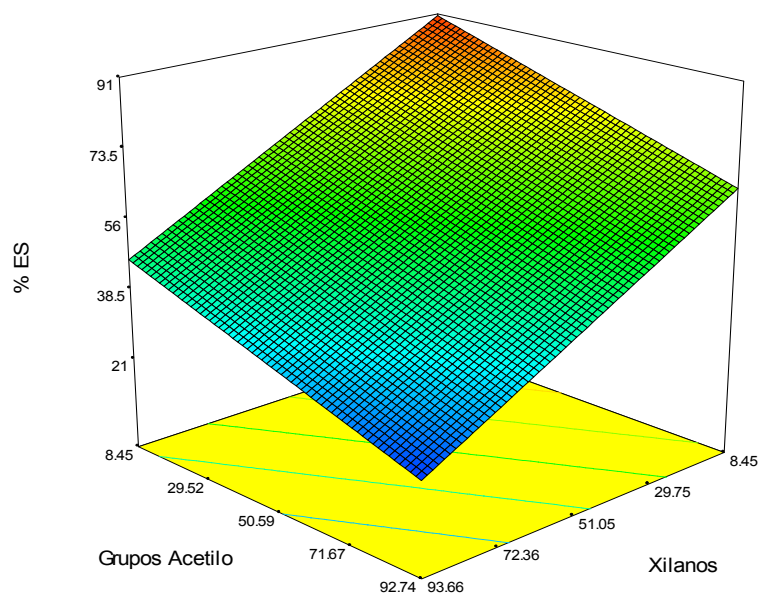
**Figura 60. Gráfico de superficie respuesta para la variable eficacia de sacarificación (ES). Carga de sustrato y sobrepresión ajustadas a valores centrales [7.5% (p/v) y 15 bares, respectivamente].**

Debido a la importancia que esta respuesta tiene en el proceso global de producción de etanol, cabe realizar un análisis más detallado de los resultados experimentales obtenidos. De la Figura 60, se deriva un aspecto a tener en cuenta en la futura optimización de esta variable. Vemos como los valores de ES tienden a seguir creciendo por encima del rango experimental estudiado. Así, para futuras investigaciones con el objetivo de encontrar un valor máximo de esta variable, se debe considerar ampliar la región experimental más allá de los límites establecidos en este modelo. El alto valor de  $R^2$ -predicho reportado por el diseño, 0,916, nos permite realizar dicha ampliación sin riesgo de cometer error predictivo alguno.

Es bien sabido que las variaciones en la digestibilidad del RSI derivan del cambio estructural que se produce en la materia prima durante la etapa del pretratamiento. En la biomasa lignocelulósica, la hemicelulosa y la lignina conforman una red molecular que envuelve a las cadenas de celulosa. La efectividad del pretratamiento en la alteración estructural de esta red es un aspecto esencial para facilitar el acceso de las enzimas a las cadenas de celulosa y por lo tanto, poder aumentar los rendimientos de HE. Como se ha descrito, a medida que aumenta la severidad del pretratamiento, los grupos acetilo así como los azúcares hemicelulósicos, son extraídos del material original, produciéndose una desestructuración del complejo hemicelulosa-celulosa-lignina, que facilita la acción de las celulasas. De hecho, en el material sin pretratar la digestibilidad alcanza valores tan bajos como un 13% de ES, en

comparación con los valores entre 50-90% del teórico encontrados en la mayoría de los RSI obtenidos tras el pretratamiento. Los mayores valores de ES los encontramos a altas temperaturas y altos tiempos de residencia, donde la desestructuración del material inicial es mayor. Como ejemplo podemos citar el 95% de ES a 200 °C y 40 min frente al 22% que podemos encontrar a 170 °C, 0 min. Sobre la efectividad del PACL para incrementar la ES de biomasa lignocelulósicas existen varias referencias bibliográficas en materiales de diversa naturaleza. Por ejemplo, se puede citar el trabajo realizado por Liu y Wyman (2005) sobre el PACL del bagazo de maíz en condiciones similares a las expuestas en este trabajo, en el que se obtuvieron valores en la ES de 88-90%. Negro y *col.* (2003a) usando el mismo dispositivo experimental utilizado en esta investigación para pretratar la madera de álamo, obtuvieron porcentajes de ES del 70% del teórico.

La presencia de xilano residual en el RSI, así como la retirada de los grupos acetilos constituyentes de las cadenas de xilanos, han sido factores discutidos por Kabel y *col.* (2007), como indicadores de la eficiencia de la etapa de pretratamiento. Estos autores demuestran que dichas variables están íntimamente relacionadas con la susceptibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Por tanto, en base a los resultados experimentales encontrados en este trabajo, se ha estudiado la influencia que estas dos variables ejercen sobre la eficacia de sacarificación, mediante un análisis de superficie respuesta de los datos representados en la Tabla 7 (Figura 61). En la determinación del orden apropiado del polinomio que justifica dicha relación, el p-valor obtenido para la regresión utilizada fue menor a 0,0001, lo cual indica que existe una relación estadística significativa entre los datos experimentales para dichas variables (nivel de confianza del 99%). Esto se ve reflejado en los índices de correlación,  $R^2$ -ajustado = 0,95 y  $R^2$ -predicho= 0,91, así como en el test de falta de ajuste, cuyo valor fue 0,563.



**Figura 61. Relación entre el contenido en xilano y grupos acetilo del RSI sobre la eficacia de sacarificación enzimática del material pretratado**

Este gráfico de superficie respuesta muestra como la cantidad de xilanos y grupos acetilo en el material inicial decrece debido al efecto del pretratamiento, con el consecuente aumento en la ES.

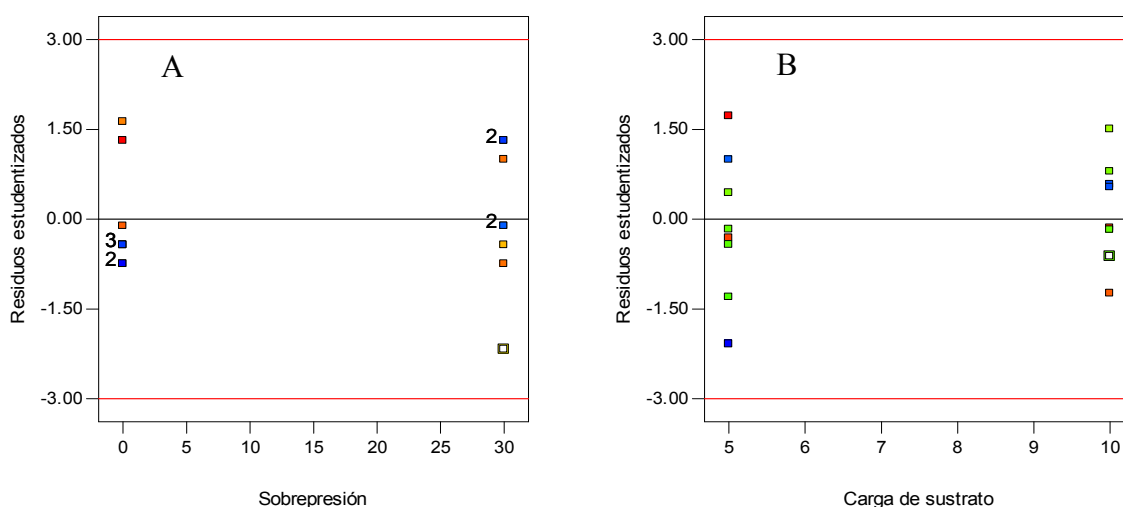
#### 4.2.1.3 Consideraciones a tener en cuenta para los posteriores estudios de optimización.

El principal aspecto a considerar después de esta etapa de la investigación es que, de los diferentes factores de proceso estudiados en el PACL de la paja de trigo; temperatura, tiempo de residencia, sobrepresión añadida en el reactor y carga de sustrato, solamente la temperatura y el tiempo mostraron tener un efecto significativo en el resultado del pretratamiento, quedando fuera de la significación estadística la sobrepresión y la carga de sustrato, considerando el intervalo experimental estudiado. Por lo tanto, para la continuidad de la investigación hacia los valores óptimos de las variables respuesta, sólo se considerarán como factores la temperatura y el tiempo.

En cuanto a las variables no significativas, se seleccionó una condición de trabajo para futuras investigaciones entre los distintos niveles estudiados, en base a un criterio básicamente económico. Es decir, en lo que respecta a la sobrepresión añadida en el reactor, y en base al coste añadido del gas introducido, se eligió el valor 0, o lo que es lo mismo, no añadir sobrepresión. Para la carga de sustrato, una mayor capacidad de procesamiento de materia prima

inicial implica un mayor ahorro energético, reduciendo, por tanto, los costes globales. Por ello, se eligió la carga del 10% p/v para el resto de los estudios de optimización.

Si además de atender al criterio económico, se tiene en cuenta la variabilidad introducida en las variables respuesta por los distintos niveles de los factores estudiados, también habría que elegir no añadir sobrepresión en el reactor e introducir la paja de trigo al 10% (p/v). Esto se puede deducir del análisis detallado del valor de los residuos estudentizados obtenidos al aplicar el diseño factorial. A modo de ejemplo, en la Figura 62 se representa dicho análisis desarrollado para la variable RAH en la fracción líquida, siendo éste representativo de lo obtenido para las demás variables respuesta.



**Figura 62. Representación de la variabilidad de los residuos estudentizados para la sobrepresión (A) y la carga de sustrato en (B) para la variable respuesta RAH en la fracción líquida**

En la Figura 62A se aprecia una mayor amplitud del valor de los residuos en el nivel alto de la sobrepresión añadida al reactor. Este hecho es todavía más notorio en la Figura 62B, donde utilizar el nivel alto de la carga de sustrato (10%) implica una menor variabilidad en los resultados.

Otro aspecto a considerar para las siguientes etapas del trabajo experimental es que para optimizar las condiciones de pretratamiento que conduzcan a un máximo valor en la digestibilidad enzimática de la paja de trigo se puede considerar un incremento del rango experimental definido hasta el momento, aumentando los valores de temperatura y tiempo de residencia.

#### 4.2.2 Pretratamiento en una etapa

En esta fase de la investigación, y una vez seleccionadas las variables del pretratamiento (factores) con efecto significativo dentro del rango experimental estudiado, se procedió a la optimización del PACL de la paja de trigo en una etapa. Esta configuración de pretratamiento se abordó de dos maneras diferentes, dependiendo del objetivo deseado. El primer esquema de trabajo tuvo como objetivo encontrar las condiciones de tiempo y temperatura que resultaran en una máxima recuperación de azúcares en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento y liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática. Posteriormente, se planteó como objetivo alternativo la búsqueda de las condiciones de tiempo y temperatura que hicieran máxima *sólo* la liberación de azúcares por hidrólisis enzimática a partir del RSI, teniendo en cuenta que la glucosa procedente de la celulosa constituye la mayor parte de los azúcares que actualmente pueden fermentarse con microorganismos disponibles a nivel industrial.

##### 4.2.2.1 Optimización del pretratamiento para maximizar la recuperación de azúcares en la fracción líquida y la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática

En esta fase del trabajo se planteó una **optimización múltiple** de las variables respuesta recuperación de azúcares hemicelulósicos (RAH) en la fracción líquida obtenida después del pretratamiento y eficacia de sacarificación (ES) del RSI, con el objetivo de hallar una condición experimental óptima donde encontrar máximos valores de ambas variables.

Con este propósito se realizó un diseño de optimización,  $2^2$  de composición central, (Diseño 2) en la región experimental delimitada por los valores de temperatura de 170 y 220 °C y tiempo de residencia entre 0 y 40 min. Estos valores fueron elegidos en base a las conclusiones extraídas en la primera fase de la investigación (Diseño 1). En este sentido, se decidió no aplicar una sobrepresión en el reactor y la carga de sustrato utilizada fue del 10% (p/p). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

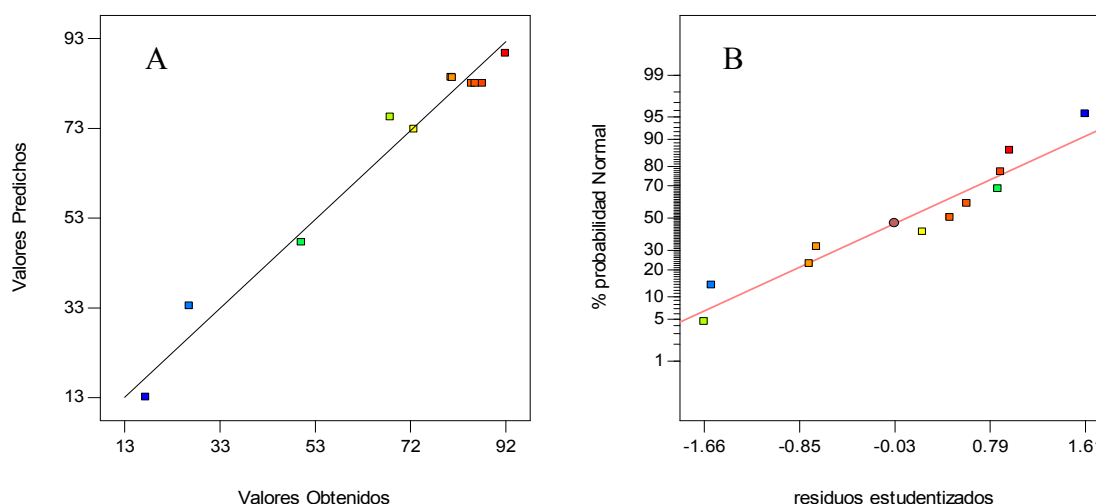
##### Diseño de experimentos

El diseño fue evaluado mediante el análisis del gráfico de valores predichos por el modelo, frente a los obtenidos experimentalmente para la variable RAH en la fracción líquida (Figura 63A), y el gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados para la ES (Figura 63B), los cuales muestran un diagnóstico favorable para el modelo matemático utilizado.



Tabla 9. Recuperación de sólidos, composición del RSI, recuperación de azúcares hemicelulósicos (g/100 g azúcar en la materia prima) y valores de pH en la fracción líquida, e índices de hidrólisis enzimática del RSI; ES (en g glucosa/100 g glucosa en RSI) y RHE (en g glucosa/100 g glucosa en materia prima), obtenidos tras el pretratamiento de la paja de trigo en una etapa (Diseño 2)

Experiencias (Diseño 2)		Recuperación de sólidos (g /100 g materia prima)		Composición RSI (% bps)				Fracción Líquida			Índices de Hidrólisis Enzimática	
°C	min			Celulosa	Xilano	Grupos acetilo	Lignina	% RAH	pH	% ES	% RHE	
170	0	85,75		47,0	25,1	1,5	19,3	9,2	5,2	17,5	16,8	
220	0	60,33		60,0	0	0,0	20,8	7,3	3,8	92,3	79,6	
170	40	74,16		54,9	17,1	1,0	23,5	46,4	4,4	49,9	48,4	
220	40	54,30		61,7	0	0,0	25,3	0,2	3,3	73,3	58,5	
170	20	80,60		51,2	20,8	1,2	19,1	32,3	4,7	26,6	26,1	
220	20	58,43		64,4	0	0,0	23,5	0,0	3,5	81,0	72,7	
195	0	77,42		54,8	13,5	0,9	20,2	50,3	4,5	68,3	69,1	
195	40	66,08		62,0	0	0,0	25,2	17,7	3,7	81,2	79,3	
195	20	72,18		57,7	4,2	0,2	23,7	30,8	4,2	85,3	83,6	
195	20	73,57		57,1	3,6	0,2	22,8	31,6	4,2	87,5	85,7	
195	20	73,23		57,8	3,6	0,2	23,4	30,5	4,1	86,0	84,8	



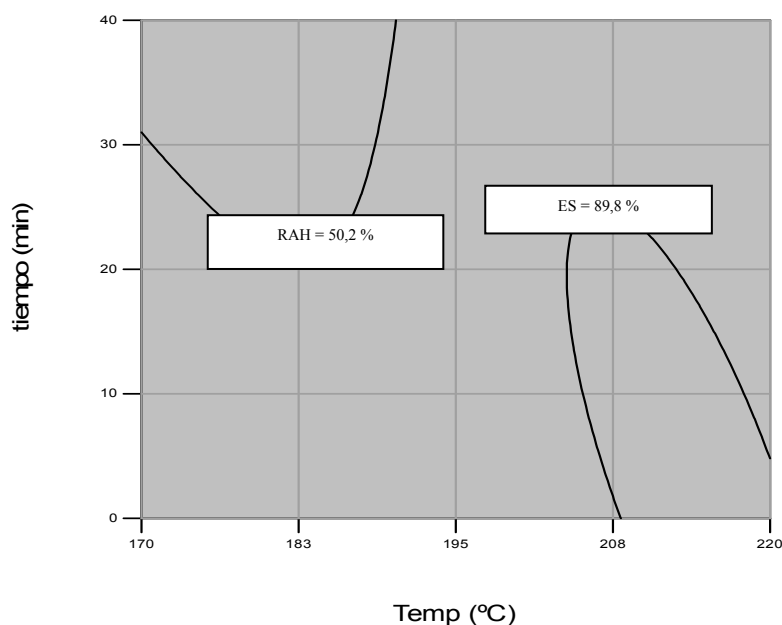
**Figura 63. Gráfico de valores predichos por el modelo frente a los experimentales para la RAH en la fracción líquida, (A), y gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados para la eficacia de sacarificación (ES) (B)**

La optimización múltiple se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de los resultados experimentales obtenidos de RAH y ES mostrados en la Tabla 9, enfocados a maximizar la función de deseabilidad (Del Castillo y *col.*, 1996). El rango de valores de esta función va desde el 0 hasta el 1. Cuando la deseabilidad está cercana al 0 indica que no hay conformidad con la meta deseada; cuando el valor es 1, representa el mejor valor posible, lo que significa una conformidad total. En los parámetros de optimización múltiple no se estableció un peso específico a ninguna de las variables respuestas seleccionadas, siendo el objetivo el máximo valor de ellas.

El análisis estadístico de los datos mostró que la condición experimental óptima donde se alcanzaban máximos valores de recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida, y glucosa después de la etapa de hidrólisis enzimática, fue **188 °C y 40 min**. En estas condiciones se obtuvo un **43,6% de RAH** y un rendimiento de **ES del 79,8%** del teórico. La función de deseabilidad mostró un valor de 0,930, lo que indica una buena optimización conforme a los datos introducidos en el diseño.

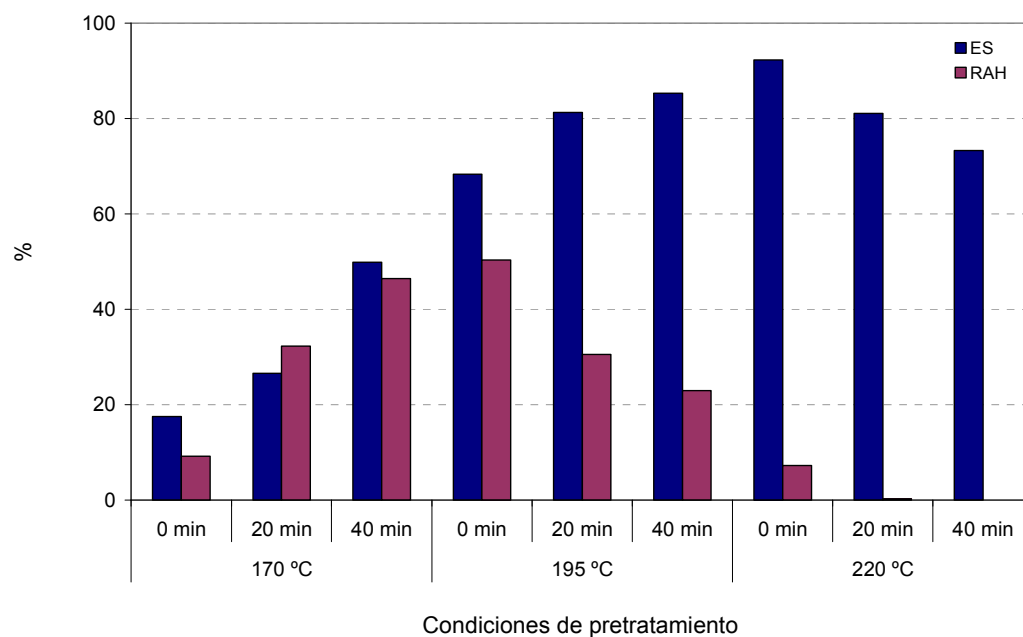
Aún habiendo obtenido un buen resultado para la función de deseabilidad, los valores de las variables respuesta definidos como óptimos se encontraban alejados de los máximos teóricos que se pueden alcanzar para dichas variables, así como de los máximos observados en la Tabla 9. Por ello se recurrió al procedimiento de optimización múltiple mediante el método gráfico (Montgomery, 2004), que consiste en representar las curvas de nivel para las variables respuesta seleccionadas, y verificar si se produce un solapamiento de las mismas, dando lugar a una zona de posibles soluciones óptimas. Como puede observarse en el gráfico de la Figura 64, los rangos

de vecindad al valor óptimo de ambas variables se encuentran en regiones experimentales muy diferentes, indicando un cierto grado de incertidumbre sobre los valores arrojados por el diseño.



**Figura 64. Gráfico de optimización múltiple para las variables RAH en la fracción líquida y ES del RSI**

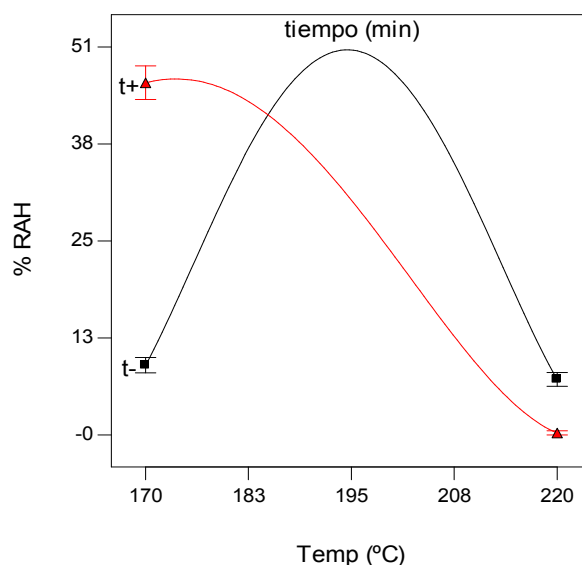
Esta falta de coincidencia en las condiciones experimentales que conducen a los máximos valores de RAH en la fracción líquida y ES del RSI se ilustra en la Figura 65, donde se representa la evolución de los valores alcanzados para las dos variables en función de las diferentes condiciones de pretratamiento. Se observa como los valores de ES ascienden desde el 17,5% a 170 °C y 0 min hasta 92,3% a 220 °C y 0 min. A partir de esta condición experimental el valor de ES desciende hasta el 73,3% en las condiciones más severas de 220 °C y 40 min. El perfil es diferente en la RAH, donde un incremento del tiempo de residencia desde 0 a 40 min a 170 °C dio lugar a un aumento en la RAH en la fracción líquida desde el 9,2 al 46,4% del contenido en la materia prima. A la temperatura de 195 °C, un incremento de los valores de tiempo por encima de 0 min, produjo un descenso en la RAH desde el 50 hasta alrededor del 31%.



**Figura 65.** Grafico comparativo de los valores de porcentaje de recuperación de azúcares en la fracción líquida (RAH, expresado como un porcentaje del contenido de azúcar en la materia prima) y eficacia de sacarificación (ES, expresado como g glucosa/100 g de glucosa potencial en RSI), para las distintas condiciones de pretratamiento del Diseño 2

#### Recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida

Las variaciones de la RAH en la fracción líquida viene determinadas por la interacción existente entre la temperatura y el tiempo de residencia (significativa con un nivel de significación del 0,05, ver Anexo I), que se representa en la Figura 66.



**Figura 66. Gráfico de interacción entre la temperatura y el tiempo de residencia para la variable RAH en la fracción líquida. Siendo t+ el nivel alto del tiempo (40 min) y t- el nivel bajo del tiempo (0 min)**

Sobre esta gráfica se observa cómo, a nivel bajo del tiempo ( $t = 0$  min), un incremento de la temperatura más allá de  $195^{\circ}\text{C}$  produce una disminución en la RAH. Así mismo, trabajar a 40 min, en el rango de temperaturas ensayado, produce un descenso de esta variable, incluso a bajas temperaturas. En base a la gráfica de interacción, se podría inferir que un valor óptimo para la RAH podría ser encontrado en torno a un rango de temperaturas delimitado por  $180$ - $190^{\circ}\text{C}$ , y valores del tiempo entre  $20$ - $40$  min.

Es bien conocido que la liberación de los azúcares hemicelulósicos de la materia prima durante la etapa de pretratamiento no siempre deriva en una recuperación en la fracción líquida, debido que estos compuestos pueden degradarse cuando las condiciones de proceso se realizan a altas temperaturas y tiempos de residencia (Klinke y *col.*, 2004). Por este motivo, se analizó el contenido en ácido acético y productos de degradación (ácidos fórmico y levulínico, furfural e HMF) de la fracción líquida. Los resultados, Tabla 10, muestran como a medida que aumentan las condiciones de tiempo y temperatura, se produce un incremento en la concentración de dichos compuestos. A  $170^{\circ}\text{C}$  y  $0$  min las cantidades de furfural, fórmico y HMF son inapreciables, mientras que a  $220^{\circ}\text{C}$  y  $20$  min, estos compuestos se encuentran en una concentración de  $2,5$ ,  $0,79$  y  $0,68$  g/l, respectivamente, coincidiendo con la ausencia de azúcares hemicelulósicos tanto en la fracción líquida como en el RSI. Estas concentraciones son del orden de las descritas en la bibliografía para fracciones líquidas procedentes del pretratamiento de otros materiales herbáceos. Cabe citar el trabajo realizado por García-Aparicio (2007), sobre

el pretratamiento de la paja de cebada mediante explosión por vapor. En la condición experimental a 210 °C y 5 min, se obtuvo una fracción líquida con una concentración en ácido acético, furfural y 5-HMF de 2,1, 0,7 y 0,2 g/l, respectivamente. Resultados similares a estos fueron obtenidos por Ohgren y col. (2006) en fracciones líquidas procedentes del pretratamiento con vapor a 200 °C durante 5 min del residuo del procesado del maíz, donde se alcanzaron concentraciones de ácido acético entre 1,6 y 2,2 g/l, y alrededor de 0,2 y 1,5 g/l de 5-HMF y furfural, respectivamente.

**Tabla 10. Concentración de ácido acético y productos de degradación en la fracción líquida en diferentes condiciones de pretratamiento de la paja de trigo**

<i>Condiciones de Proceso</i>		<i>Fórmico</i>	<i>Acético</i>	<i>HMF</i>	<i>Furfural</i>	<i>Levulínico</i>
<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>g / l</i>				
170	0	0,18	1,35	<0,01	0,01	-
220	0	0,72	3,20	0,61	1,79	0,08
170	40	0,57	3,09	0,02	0,15	-
220	40	0,65	2,97	0,79	2,01	0,07
170	20	0,20	1,11	0,01	0,10	-
220	20	0,79	3,36	0,64	2,50	0,09
195	0	0,18	1,18	0,01	0,22	-
195	40	0,72	2,86	0,30	2,02	0,06
195	20	0,57	2,29	0,08	1,48	-
195	20	0,63	2,10	0,07	1,52	-
195	20	0,54	2,31	0,08	1,31	-

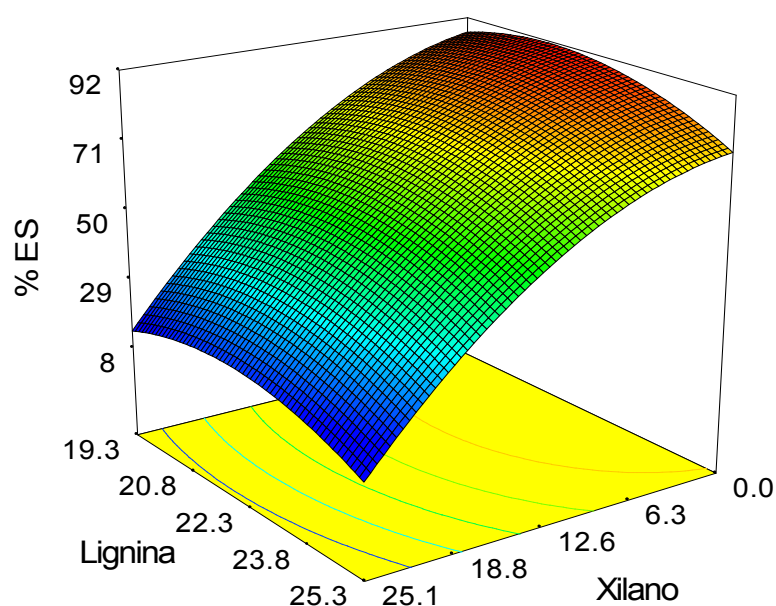
#### Digestibilidad enzimática del RSI

La alteración estructural de la materia prima producida como consecuencia del efecto de los factores temperatura y tiempo, repercute directamente en la digestibilidad enzimática de la paja de trigo pretratada. Así, la progresiva retirada de hemicelulosas y grupos acetilo de la materia prima como consecuencia de un incremento en la severidad del pretratamiento provoca una mejora en el índice de digestibilidad enzimática ES, cuyos valores aumentan desde un 17,5% del teórico a 170 °C hasta un 92,3% a 220 °C y 0 min. La disminución del contenido en xilano del RSI a medida que aumentan las condiciones de tiempo y temperatura coincide con la variación del contenido en grupos acetilo del RSI (Tabla 9). A 170 °C y tiempo 0 min, donde solamente se retira un mínima cantidad de xilano de la materia prima (25% bps en RSI, correspondiente al 94,5% del contenido en la materia prima), la mayoría de los acetilos permanecen en el RSI, 1,5% bps, correspondiente al 99% de los grupos acetilos contenidos en la materia prima. Un incremento del tiempo (40 min) a la misma temperatura, da lugar a una disminución en el contenido de este componente, hasta el valor de 1% (55% del contenido en la

materia prima), a la vez que el contenido en xilano del RSI desciende hasta el 17,1% bps. En base a los resultados obtenidos en el rango experimental definido por los valores de temperatura y tiempo, 195-220 °C y 0-40 min, para el contenido de grupos acetilo y xilano del RSI, se confirma la relación lineal existente entre ambos componentes, ya descrita en el punto 4.2.1.2.4. Dicha relación entre ambas variables también ha sido observada por Garrote y *col.* (2002) en un estudio sobre el uso del factor de severidad durante el tratamiento hidrotérmico de varios materiales lignocelulósicos tales como madera de eucalipto y residuo del procesado del maíz.

Por otra parte, la lignina, que junto con la hemicelulosa forma un entramado molecular que envuelve a la celulosa (Bidlack y *col.*, 1992), juega un importante papel en la digestibilidad del residuo pretratado (Chang y Holtzapple, 2000; Laureano-Perez y *col.*, 2005). Los resultados obtenidos del contenido en lignina del RSI (Tabla 9) muestran valores de hasta el 23-25% bps en las condiciones más severas de pretratamiento.

Con el fin de evaluar el efecto que los componentes hemicelulosa y lignina ejercen sobre la ES del RSI, en la Figura 67 se representa el gráfico de superficie respuesta de las tres variables. Se puede apreciar como el contenido en xilano ejerce un mayor efecto sobre la ES que la cantidad de lignina, es decir las variaciones que produce la disminución del contenido en xilano son más significativas que el cambio en la cantidad de lignina presente en el RSI. Este resultado apoyaría la idea de que la retirada de hemicelulosa y la consecuente rotura de las uniones celulosa-hemicelulosa-lignina constituyen factores más relevantes que el contenido en lignina del RSI sobre el incremento de la degradabilidad de la celulosa después del pretratamiento de la paja de trigo.



**Figura 67.** Gráfico de superficie respuesta para la eficacia de sacarificación (ES) del RSI, en función de su contenido en lignina y en hemicelulosa.

No obstante, a 220 °C, donde no se detectan hemicelulosas en el RSI, se produce un ligero descenso en los rendimientos de ES cuando el tiempo incrementa de 0 a 20 y 40 min, a la vez que el contenido en lignina alcanza su máximo valor. Este hecho parece indicar que pueden existir reacciones de repolimerización o condensación sufridas por la lignina en las condiciones más severas de pretratamiento, dando lugar a productos que interfieren en la accesibilidad de las enzimas a los sitios de unión con la celulosa (Sun y Cheng, 2002), lo que produce una disminución de la digestibilidad enzimática. En este sentido Chernoglazov y *col.* (1988) observaron que celulasas purificadas de *Tichoderma reesei* pueden ser adsorbidas sobre la lignina, quedando su actividad enzimática inactiva. Este hecho se acentúa cuando las condiciones de pretratamiento hidrotérmico son más severas, debido a un aumento del área superficial del sustrato, lo que incrementa las posibilidades de unión a sitios inespecíficos (Nidetzky y *col.*, 1992).

Los datos recogidos en la bibliografía sobre el efecto del contenido en lignina en la ES de residuos pretratados, muestran diferencias dependiendo del tipo de sustrato y tratamiento empleado. Liu y Wyman (2005) obtuvieron buenos rendimientos de sacarificación enzimática (valores en torno al 85% del teórico) en bagazo de maíz pretratado por ACL con un contenido en lignina del 25%. Así mismo, Sreenath y *col.* (1999), alcanzaron, en el PACL de fibra de alfalfa y tras 96 h. de sacarificación enzimática, rendimientos en ES cercanos al 100% del teórico. Por el contrario, Chang y Holtzapple (2000) concluyeron que, tras el pretratamiento ácido de la madera de chopo, el contenido en lignina del material pretratado tuvo una mayor influencia sobre la digestibilidad enzimática que la cantidad de hemicelulosa residual.

Cuando la ES se refiere al contenido de glucosa en la materia prima, se expresa como RHE (Tabla 9). En la mayoría de las condiciones, los valores de esta variable son similares a los de ES, excepto para la temperatura de 200 °C a 20 y 40 min, donde se produce una cierta solubilización de glucosa durante el pretratamiento. Según estos resultados, el rendimiento de hidrólisis respecto a la materia prima más elevado, entre el 85-87%, se alcanza a 195 °C 20 min.

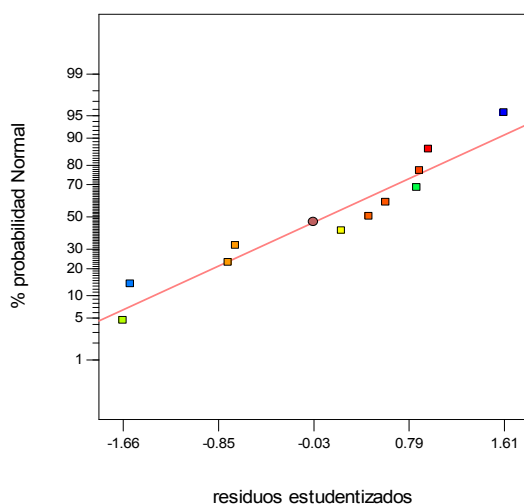
Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo permiten la selección de una condición óptima de pretratamiento de la paja de trigo en una etapa, que da como resultado un compromiso entre el máximo rendimiento de glucosa por HE y la máxima recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida: 188 °C y 40 min de residencia en el reactor. No obstante, el análisis de los resultados experimentales mediante el diseño de experimentos utilizado permite concluir que realizando un estudio de optimización de estas variables por separado, se podrían mejorar los rendimientos obtenidos. Esto conduce a plantear la idoneidad de un pretratamiento en dos etapas.



#### 4.2.2.2 Optimización del pretratamiento para maximizar la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática

Alcanzar un máximo rendimiento de liberación y recuperación de todos azúcares contenidos en la materia prima en una sola etapa de pretratamiento es un reto limitado debido a las características estructurales de la paja de trigo. Como se ha observado, las condiciones que conducen a los máximos valores de obtención de glucosa resultan en una degradación de los azúcares hemicelulósicos disueltos en la fracción líquida. Por ello, ante la incapacidad de obtener una condición experimental que proporcione valores de RAH y ES cercanos a los máximos teóricos, y teniendo en cuenta que los microorganismos fermentadores usados a nivel industrial son fermentadores de hexosas, se planteó la optimización de las condiciones de pretratamiento que condujeran sólo a una máxima liberación de glucosa por hidrólisis enzimática, como una de las opciones a considerar en el proceso de obtención de etanol a partir de la paja de trigo.

Para este fin, se realizó un nuevo análisis estadístico de los resultados experimentales representados en la Tabla 9, con el objetivo de maximizar sólo la variable eficacia de sacarificación (ES) obtenida sobre el RSI. El modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue un modelo cuadrático, caracterizado por los parámetros de regresión;  $R^2$  ajustado = 0,944,  $R^2$  predicho = 0,800 y “test de falta de ajuste” = 0,071, el cual se encontró por encima del nivel de significación establecido del 0,05. Estos valores, junto con el gráfico de probabilidad normal de los residuos, representado en la Figura 68, permiten explorar la región experimental sin riesgo de cometer errores predictivos.

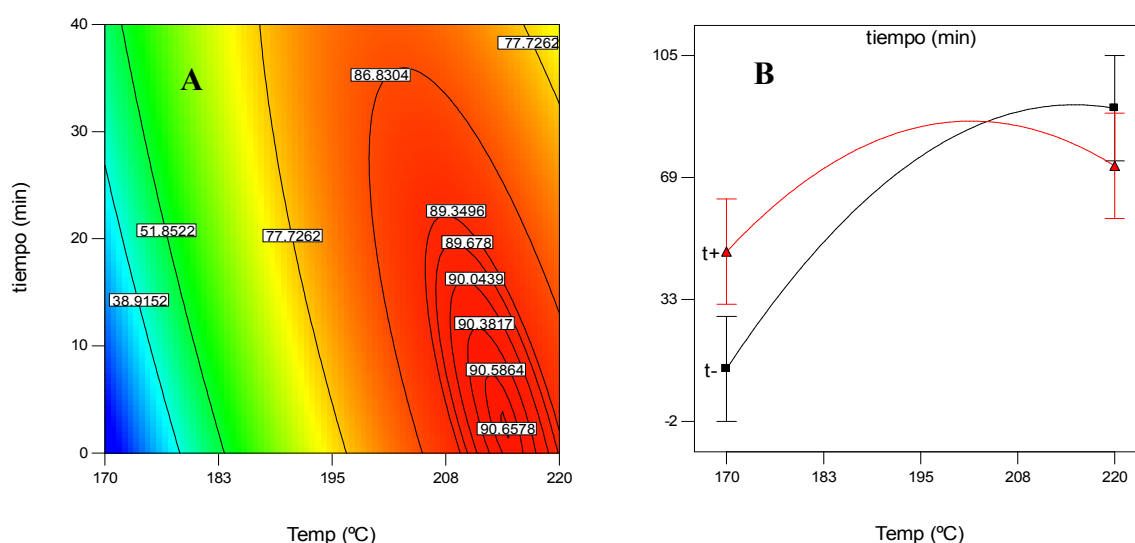


**Figura 68.** Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la variable eficacia de sacarificación enzimática (ES)

El ajuste que el modelo matemático realiza para la ES en función de la temperatura (T) y el tiempo de residencia (t) viene determinado por la siguiente ecuación:

$$\%ES = 82,91 + 25,45T + 4,38t - 12,84Tt - 24,10T^2 - 3,10t^2 \quad (1)$$

La Figura 69A muestra el gráfico de contorno definido por la ecuación (1). En ella, se observa como el diseño conduce hacia una condición experimental dentro del rango estudiado donde se alcanza un valor óptimo para la variable eficacia de sacarificación, **90,6%** del teórico. Esta condición es **214 °C y 2,7 min** (3 minutos).



**Figura 69.** Gráfico de contorno, A, y gráfico de interacción de los factores temperatura y tiempo de residencia, B, para la eficacia de sacarificación (ES). Siendo t+ el nivel alto del tiempo (40 min) y t- el nivel bajo del tiempo (0 min)

Este valor máximo de ES está determinado por la interacción existente entre los factores temperatura y tiempo de residencia, que mostró un p-valor por debajo del nivel de significación establecido ( $p < 0,05$ ) (Anexo I). En la Figura 69B se puede apreciar como los valores de ES se ven afectados por el nivel alto del factor tiempo,  $t+ = 40$  min, a partir de un determinado valor de temperatura,  $\sim 200$  °C, por encima del cual el porcentaje de ES empieza a descender, hecho no observable a nivel bajo del factor tiempo (0 min). Así, como se puede ver en la Tabla 9, a la temperatura de 220 °C se produce un descenso en la ES desde el 92 hasta el 73% cuando el tiempo incrementa desde 0 hasta 40 min.

#### 4.2.2.3 Verificación de las condiciones óptimas de pretratamiento

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de experimentación predichas por el diseño para los dos objetivos planteados en el pretratamiento en una etapa de la paja de trigo [188 °C y 40 min para la optimización múltiple (condición óptima A) y 214 °C y 2,7 min (3 minutos) para la optimización de la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática (condición óptima B)], se realizaron experimentos de pretratamiento en dichas condiciones con el fin de verificarlas experimentalmente. Los resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación de sólidos, la composición del RSI, la recuperación de azúcares en el prehidrolizado y la eficacia de sacarificación (ES), se muestran en la Tabla 11. Como se puede apreciar, los valores experimentales obtenidos concuerdan con los valores predichos por el diseño de experimentos (para un intervalo de confianza del 99%). En el caso de la optimización múltiple de las variables respuesta (condición A), tanto los valores de recuperación de azúcares hemicelulósicos, (medidos como xilosa sobre la fracción líquida) como los de eficacia de sacarificación de la celulosa del RSI, se encontraron en el rango previsto por el modelo. En la Tabla también se incluyen los datos de recuperación de glucosa en la fracción líquida con el fin de poder calcular el rendimiento global de azúcares en estos experimentos de verificación. Con este mismo fin, en la Tabla se muestra la eficacia de liberación de xilosa por hidrólisis enzimática, que se calculó a partir de la medida de la xilosa liberada en los ensayos de HE con celulasas.

Los resultados de RAH y ES alcanzados en las condiciones óptimas del diseño de optimización múltiple, 188 °C y 40 min, son del orden de los obtenido por otros autores en el pretratamiento de la paja de trigo. Schmidt y Thomsen (1998) en una investigación sobre la optimización de las condiciones de pretratamiento mediante oxidación húmeda de la paja de trigo, con el propósito de evaluar la influencia que la presión de oxígeno, la temperatura y el tiempo de reacción ejercen en la solubilización de los azúcares hemicelulósicos, la digestibilidad enzimática de la celulosa y la recuperación global de carbohidratos, determinaron que las condiciones óptimas encontradas para el pretratamiento de la paja de trigo fueron 185 °C, 15 min, 6,5 g/l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 12 bares de  $\text{O}_2$ . En estas condiciones, la máxima recuperación de azúcares hemicelulósicos, respecto a la materia prima, fue del 60%, y el óptimo valor obtenido para la eficacia de sacarificación fue del 80% del teórico. En este trabajo se alcanza una mayor RAH que el alcanzado en esta investigación, debido posiblemente a que se emplea un agente hidrolítico externo y a unas condiciones menos severas de temperatura y tiempo.

En cuanto al valor experimental de ES de la celulosa del RSI en la condición óptima B, también se encontró dentro del rango predicho por el modelo. Si se calcula el valor de RHE para esta condición, se obtiene un 85,1% del teórico, que como se puede apreciar en la Tabla 11, está dentro del rango de valores máximos obtenidos en el rango experimental estudiado. Este resultado mejora claramente algunos de los datos encontrados en la bibliografía sobre diferentes

pretratamientos hidrotérmicos de la paja de trigo. En este sentido, la explosión por vapor fue el pretratamiento elegido por Tabka y col. (2006) para realizar un estudio sobre la sacarificación enzimática de la paja de trigo para la producción de etanol mediante un tratamiento enzimático complejo. La materia prima fue impregnada en una solución ácida (0,08 N de  $H_2SO_4$ ) y sometida a una presión de 100 bares durante 1 minuto. El material resultante se sometió a una explosión por vapor a 18 bares en un reactor discontinuo y posteriormente, a la acción de un complejo enzimático formado por celulasas, xilanasas, esterasas y oxidoreductasas. Los mejores rendimientos en HE se obtuvieron cuando se utilizó una mezcla de celulasa, xilanasas, ácido ferúlico esterasa y la adición de un surfactante no iónico (Tween 20), alcanzando valores en torno al 75% del teórico.

También en paja de trigo, Beltrame y col. (1992) estudiaron la efectividad del pretratamiento mediante explosión por vapor (sin adición de agentes hidrolíticos) sobre la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. En el residuo de paja de trigo pretratada a 210 °C durante 10 min se obtuvo una eficacia de sacarificación del 85%, aunque cabe destacar que los ensayos de HE se realizaron con una carga de sustrato del 1%, y una carga de celulasas de 30 UPF/g sustrato.

Tabla 11. Composición del residuo sólido insoluble, recuperación de azúcares en la fracción líquida y eficacia de sacarificación del RSI obtenido en las condiciones óptimas del pretratamiento de la paja de trigo en una etapa.

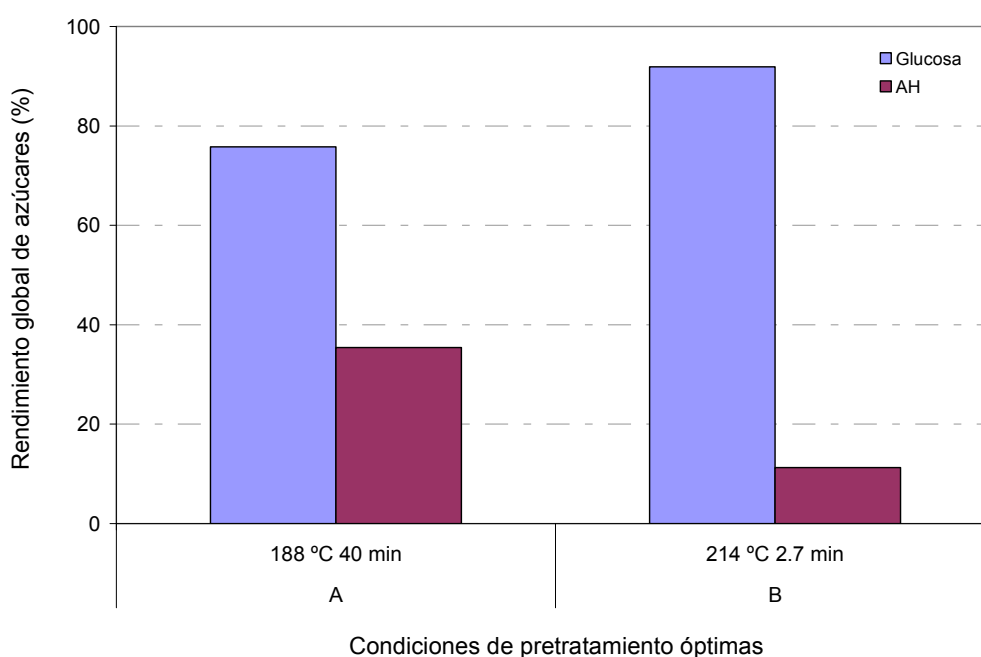
Condiciones Óptimas	% RS	RSI (% bps)		Recuperación de azúcares en la fracción líquida (g / 100 g azúcar en materia prima)								% ES (% del teórico)	
		Celulosa	Xilano	Lignina	Glucosa		Xilosa		Celulosa		Xilano		
					Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha	
A) 188 °C 40 min	66	52,2	2,8	22,6	1,9	1,8 (1,5-2,1)	7,2	9,3 (7-11,6)	76,3	79,8 (74,8-84,8)	20,6	18,3	
B) 214 °C 2.7 min	61	55,6	n.d	26,8	0,7	0,5 (0,4-0,6)	2,4	3,4 (2,5-3,7)	91,2	90,6 (89,7-91,5)	ndt.	ndt.	

ndt. = no determinado

los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza de la predicción del 99%

## 4.2.2.4 Rendimiento global de azúcares

Esta variable permite conocer la cantidad global de azúcares fermentables que se podrían obtener tras las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Se calcula considerando la cantidad de azúcares generados, en forma monomérica, en las etapas de pretratamiento e hidrólisis, referida a la materia prima (apdo. 3.6, variable RGA). El rendimiento global de glucosa y azúcares hemicelulósicos (AH) se ha calculado en las condiciones experimentales óptimas verificadas para los dos objetivos planteados en el pretratamiento en una etapa. Los resultados obtenidos se representan en el gráfico de la Figura 70.



**Figura 70. Rendimiento global de glucosa y azúcares hemicelulósicos (AH), expresado como porcentaje del contenido en la materia prima, en las condiciones experimentales óptimas verificadas. A: Optimización múltiple; B: Optimización de la liberación de azúcares del RSI por hidrólisis enzimática.**

Respecto al rendimiento global de glucosa, la condición experimental más favorable corresponde a 214 °C y 2,7 min, donde se ha realizado una optimización dirigida a maximizar la liberación de este azúcar por HE. Según el resultado obtenido en esta configuración de pretratamiento, un 91% de la glucosa presente en la materia prima estaría disponible para fermentación tras la etapa de HE. En la optimización múltiple, el rendimiento global de glucosa alcanzó valores más bajos que en el caso anterior, 76% del teórico, mientras que el rendimiento de AH alcanzó un valor de 36 g/100 g de materia prima.

El hecho de que valores máximos de rendimientos globales de glucosa y AH se alcancen en diferentes condiciones experimentales de temperatura y tiempo, es un hecho descrito en la bibliografía para este y otros residuos lignocelulósicos sometidos a distintos pretratamientos hidrotérmicos. Ohgren y *col.* (2005), en un estudio sobre la optimización del pretratamiento mediante explosión por vapor del residuo de maíz impregnado con  $\text{SO}_2$ , tampoco encontraron una condición experimental en la cual se obtuvieran simultáneamente máximas rendimientos globales de los azúcares contenidos en la materia prima. El máximo rendimiento global de xilosa fue encontrada a 190 °C y 2 min, alcanzándose un valor de 78% del teórico. Un valor considerablemente alto, debido al uso de un agente hidrolítico ácido durante la etapa de pretratamiento. Para la glucosa se obtuvo un rendimiento del 89% del teórico, en la condición 210 °C y 10 min, resultando este valor muy similar al encontrado en el trabajo de investigación de esta tesis.

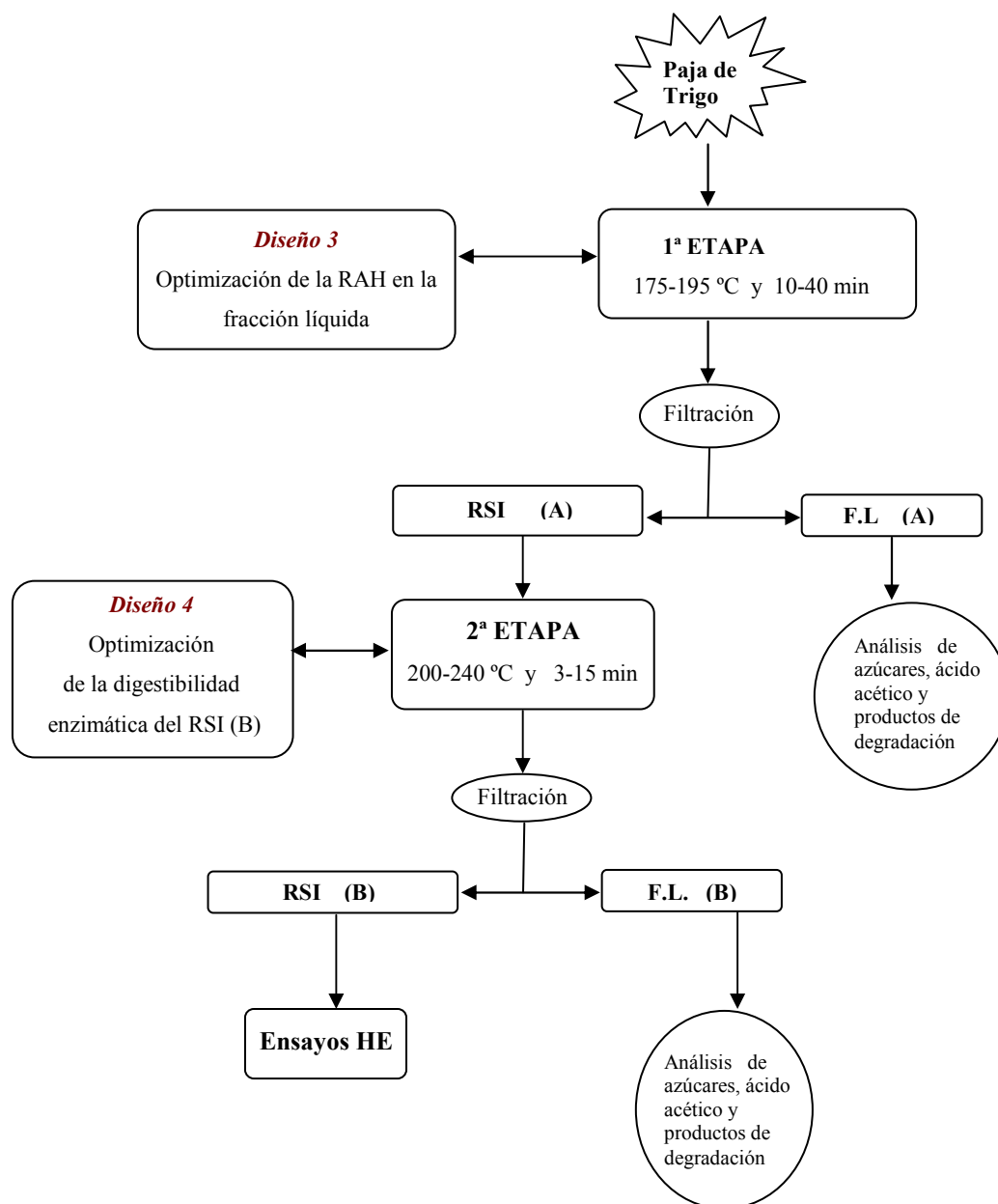
De relevante importancia, desde el punto de vista de la aplicación del pretratamiento a escala piloto, es el trabajo realizado por Thygesen A. y *col.* (2004) sobre el pretratamiento hidrotérmico de la paja de trigo en una planta piloto con capacidad para procesar 100 kg biomasa/h. El objetivo era encontrar una condición experimental donde maximizar el rendimiento global de todos los azúcares. Tras un PACL en contracorriente (190 °C y 20 min) y la etapa de hidrólisis enzimática, el máximo rendimiento de azúcares fermentables a etanol, respecto a su contenido en la materia prima, fue del 83% y el 59% para la glucosa y xilosa, respectivamente. Cabe destacar que en este trabajo se alcanza un mejor rendimiento de azúcares hemicelulósicos, debido a la configuración de PACL en contracorriente utilizada, la cual evita que se degraden estos azúcares. Así mismo, se alcanza un mayor rendimiento global de glucosa, probablemente debido a que en la etapa de HE se utilizó una mayor carga de celulasas, 25 UPF/g sustrato, que la utilizada en esta investigación (15 UPF/g sustrato).

A la vista de los resultados obtenidos del estudio del pretratamiento en una etapa, se infiere que en ninguno de los objetivos planteados en esta configuración y optimización de la ES del RSI se produce un buen rendimiento global de recuperación de los azúcares hemicelulósicos contenidos en la materia prima. Como ya se ha comentado a lo largo de la discusión de los resultados, las condiciones de temperatura y tiempo que conducen a un compromiso entre el rendimiento de glucosa y AH (optimización múltiple) dan como resultado valores alejados de los máximos teóricos, y las que conducen a los máximos valores de obtención de glucosa por EH (optimización de la ES del RSI), resultan en una degradación de los azúcares hemicelulósicos disueltos en la fracción líquida. Por consiguiente, en base a estas consideraciones, se planteó abordar el proceso de pretratamiento en dos etapas; una primera etapa diseñada con el objetivo de recuperar la máxima cantidad de azúcares derivados de las hemicelulosas, y una segunda etapa, planteada para extraer la máxima cantidad de glucosa.

#### **4.2.3 Pretratamiento en dos etapas**

El pretratamiento basado en dos etapas tiene como objetivo conseguir un máximo rendimiento de liberación y recuperación de todos los azúcares presentes en la materia prima. Para ello, en una primera etapa se plantea la maximización de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida (FL), para en una segunda etapa y sobre el residuo sólido insoluble (RSI) de la primera, maximizar su digestibilidad enzimática. En el desarrollo de esta configuración, en primer lugar se pretrató la paja de trigo según las condiciones de un diseño de optimización (Diseño 4), establecido con el único objetivo de optimizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la FL. El RSI generado en esta primera etapa (RSI A), obtenido por separación del material pretratado y lavado con agua, se sometió a las condiciones de un nuevo diseño de optimización (Diseño 5), dirigido a maximizar la liberación de glucosa por HE de la celulosa contenida en el mismo. Un esquema de los pasos llevados a cabo en el pretratamiento en dos etapas se muestra en la Figura 71.





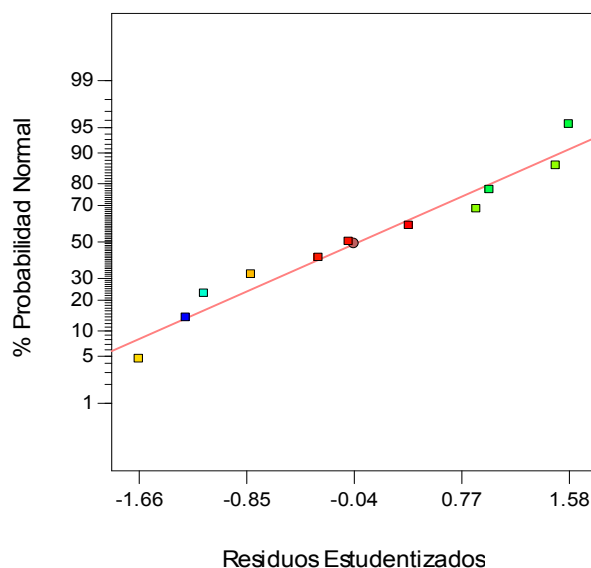
**Figura 71.** Esquema de trabajo en el pretratamiento en dos etapas de la paja de trigo. RSI: residuo sólido insoluble. F.L.: fracción líquida.

#### 4.2.3.1 Primera etapa de pretratamiento. Optimización de la RAH en la fracción líquida.

La información obtenida en las anteriores etapas de la investigación se utilizó en la selección de las condiciones de pretratamiento dirigidas a encontrar una condición experimental óptima donde obtener un valor máximo para la RAH. En este sentido, en el apdo. 4.2.1.1.3, se pudo observar como alrededor de la condición experimental 180 °C y 20 min se alcanzaba el máximo valor de RAH en la fracción líquida, dentro del amplio rango experimental estudiado.

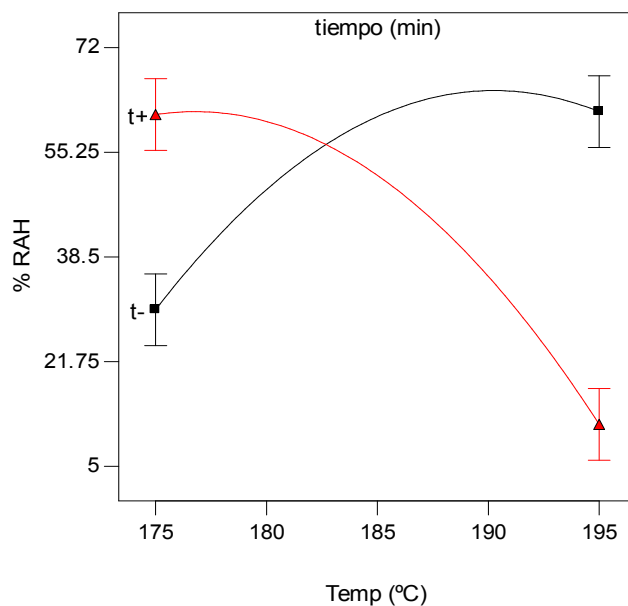
Así mismo, el análisis de esta variable en el pretratamiento en una etapa (apdo. 4.2.2.1) mostró como a partir de 195 °C, los rendimientos de RAH empiezan a decrecer a consecuencia de la degradación de los mismos. Por tanto, con el objetivo de cubrir una región experimental donde el máximo valor esperado para la RAH se encontrase en la parte central de la misma, se establecieron los valores de los niveles para el factor temperatura entre 175 y 195 °C, y entre 10 y 40 min para el factor tiempo. En base a estos valores se construyó un diseño de optimización de composición central,  $2^2$ , con tres puntos centrales (Diseño 3). Los resultados experimentales obtenidos sobre la caracterización de la fracción líquida, así como para la concentración de productos de degradación, se muestran en la Tabla 12.

En cuanto a la validez del diseño de experimentos, en la Figura 72 se muestra la normalidad de los residuos en el rango experimental estudiado, que certifica que las conclusiones que se hagan en base a los resultados mostrados por el diseño son correctas.



**Figura 72. Gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados internamente para el modelo matemático utilizado en la optimización de la RAH en la fracción líquida obtenida en la primera etapa del pretratamiento**

La variación de la RAH en la fracción líquida en función de las distintas condiciones experimentales estudiadas, vino definida por la interacción significativa ( $p\text{-valor} < 0,05$ , ver Anexo I) existente entre la temperatura y el tiempo de residencia, representada en la Figura 73.



**Figura 73. Gráfico de interacción entre temperatura y tiempo para la RAH en la fracción líquida obtenida en la primera etapa del pretratamiento. Siendo t+ el nivel alto del tiempo (40 min) y t- el nivel bajo del tiempo (10 min)**

El análisis conjunto de la Figura 73 y de los datos experimentales mostrados en la Tabla 12, revela como a partir de 195 °C y 10 min, el porcentaje de recuperación decrece progresivamente hasta los valores más bajos de 9,7% a 195 °C y 40 min. Se observa como a tiempos prolongados de residencia en el reactor (40 min), la temperatura ejerce un marcado efecto negativo sobre el porcentaje de RAH, pasando desde 58,7% a 175 °C a 9,7% a 195 °C. Por el contrario, y puesto que existe interacción entre los factores, a tiempos cortos de pretratamiento, 10 min, un incremento de la temperatura produce un efecto positivo en la RAH, incrementando los valores de un 28,2% a 175 °C a 60,5% a 195 °C. Igualmente, si se observa lo ocurrido a 175 °C, se aprecia como un aumento de 10 a 40 min dio lugar a un aumento en la RAH desde el 28,2 hasta el 58,7%, respectivamente, aunque el mismo incremento de tiempo a 195 °C dio lugar a un descenso en los porcentajes de RAH desde 60,4 hasta 9,7%, respectivamente.

En la Tabla 12 se muestran los valores del porcentaje de oligómeros en el total de azúcares detectados en la fracción líquida generada en las distintas condiciones de pretratamiento. Es importante señalar que los azúcares glucosa, arabinosa y galactosa se detectaron en la fracción líquida siempre en forma monomérica, mientras que la xilosa fue obtenida mayoritariamente en forma oligomérica. Como puede observarse, en la mayoría de las condiciones el porcentaje de oligómeros (xilo-oligosacáridos) se encuentra alrededor del 90-

95%, excepto en las condiciones más severas (185 °C y 46 min, 195 °C y 40 min y 199 °C y 25 min), donde esta proporción disminuye a valores del 75, 20 y 22%.

La disminución de los valores de RAH como resultado de la interacción existente entre la temperatura y el tiempo, tiene su base en la generación de productos de degradación de los azúcares hemicelulósicos, que ocurre en las condiciones de pretratamiento más severas. En estas condiciones, los monómeros en disolución sufren una degradación por efecto de la temperatura y la acidificación del medio, como se refleja en la detección en la fracción líquida de una cierta concentración de furfural, 5-HMF y ácido fórmico. Como puede observarse en la Tabla 12, las mayores cantidades de furfural se encuentran a 195 °C y 40 min, 199,1 °C y 25 min, y 185 °C y 46,2 min donde se alcanzan 1,5, 1,1 y 1,1 g/100 g de materia prima, respectivamente, coincidiendo con los bajos porcentajes de RAH. En estas mismas condiciones experimentales se observan también las mayores cantidades de ácido fórmico, 0,8, 0,7 y 0,6 g/l, respectivamente. En la mayoría de las condiciones experimentales la cantidad de fórmico no sobrepasó los 0,3 g/l.

En cuanto a la variación del pH, Tabla 12, los valores más bajos (3,8-4,0) se midieron en aquellas condiciones donde se encontró mayor concentración de ácidos acético y fórmico en la fracción líquida, coincidiendo a su vez con las recuperaciones más bajas de azúcares hemicelulósicos. En la mayoría de los casos, el pH se mantuvo por encima de 4, lo que contribuye a evitar que se produzcan mayores degradaciones de los azúcares disueltos en la fracción líquida. Weil y *col.* (1998) han señalado la importancia de mantener el pH en valores por encima de 4 durante los tratamientos hidrotérmicos, para minimizar esta degradación. En los tratamientos que emplean agentes ácidos, el control de pH se ha descrito como una herramienta esencial para evitar la degradación sufrida por los azúcares en productos potencialmente inhibidores de la hidrólisis y fermentación (Mosier y *col.*, 1999).

**Tabla 12. Porcentaje de recuperación de sólidos, recuperación de azúcares y total de recuperación de azúcares hemicelulósicos (RAH, como porcentaje del contenido de azúcares en materia prima), porcentaje de oligómeros en el total de azúcares solubilizados, valores de pH y concentración de inhibidores en la fracción líquida obtenida tras la primera etapa de pretratamiento de la paja de trigo (Diseño 3)**

<i>Experiencias (Diseño 3)</i>			<i>FRACCIÓN LÍQUIDA</i>										
<i>°C</i>	<i>min</i>	<i>%RS</i>	<i>Azúcares (g / 100 g azúcar en materia prima)</i>				<i>% RAH</i>	<i>% Oligómeros*</i>	<i>pH</i>	<i>Inhibidores (g/l)</i>			
			<i>Glucosa</i>	<i>Xilosa</i>	<i>Galactosa</i>	<i>Arabinosa</i>				<i>Fórmico</i>	<i>Acético</i>	<i>HMF</i>	<i>Furfural</i>
<i>175</i>	<i>10</i>	<i>71,8</i>	<i>1,5</i>	<i>23,9</i>	<i>68,1</i>	<i>57,0</i>	<i>28,2</i>	<i>99,21</i>	<i>4,7</i>	<i>&lt;0,1</i>	<i>0,9</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
<i>195</i>	<i>10</i>	<i>61,4</i>	<i>2,4</i>	<i>58,3</i>	<i>71,4</i>	<i>76,5</i>	<i>60,5</i>	<i>91,93</i>	<i>4,3</i>	<i>0,2</i>	<i>1,4</i>	<i>n.d</i>	<i>0,4</i>
<i>175</i>	<i>40</i>	<i>65,4</i>	<i>2,4</i>	<i>57,9</i>	<i>70,9</i>	<i>55,5</i>	<i>58,7</i>	<i>96,03</i>	<i>4,4</i>	<i>0,2</i>	<i>1,6</i>	<i>n.d</i>	<i>0,2</i>
<i>195</i>	<i>40</i>	<i>57,6</i>	<i>1,3</i>	<i>9,4</i>	<i>5,5</i>	<i>16,0</i>	<i>9,7</i>	<i>22,00</i>	<i>3,8</i>	<i>0,8</i>	<i>2,9</i>	<i>n.d</i>	<i>1,5</i>
<i>170,9</i>	<i>25</i>	<i>70,6</i>	<i>6,8</i>	<i>43,4</i>	<i>93,8</i>	<i>98,5</i>	<i>49,6</i>	<i>98,36</i>	<i>4,6</i>	<i>0,1</i>	<i>1,2</i>	<i>n.d</i>	<i>0,1</i>
<i>199,1</i>	<i>25</i>	<i>58,3</i>	<i>5,1</i>	<i>32,5</i>	<i>29,4</i>	<i>87,1</i>	<i>12,5</i>	<i>20,30</i>	<i>3,9</i>	<i>0,7</i>	<i>2,5</i>	<i>0,2</i>	<i>1,1</i>
<i>185</i>	<i>3,8</i>	<i>67,0</i>	<i>4,8</i>	<i>47,4</i>	<i>72,9</i>	<i>55,3</i>	<i>49,4</i>	<i>98,08</i>	<i>4,7</i>	<i>0,1</i>	<i>1,1</i>	<i>n.d</i>	<i>0,1</i>
<i>185</i>	<i>46,2</i>	<i>62,5</i>	<i>3,0</i>	<i>35,4</i>	<i>28,7</i>	<i>63,6</i>	<i>37,2</i>	<i>75,58</i>	<i>4,0</i>	<i>0,6</i>	<i>1,9</i>	<i>0,1</i>	<i>1,1</i>
<i>185</i>	<i>25</i>	<i>65,0</i>	<i>3,0</i>	<i>67,8</i>	<i>72,4</i>	<i>98,6</i>	<i>70,5</i>	<i>95,44</i>	<i>4,3</i>	<i>0,1</i>	<i>0,9</i>	<i>n.d</i>	<i>0,3</i>
<i>185</i>	<i>25</i>	<i>65,9</i>	<i>2,7</i>	<i>68,3</i>	<i>83,9</i>	<i>92,0</i>	<i>71,0</i>	<i>93,05</i>	<i>4,2</i>	<i>0,2</i>	<i>1,1</i>	<i>n.d</i>	<i>0,4</i>
<i>185</i>	<i>25</i>	<i>64,5</i>	<i>2,3</i>	<i>69,8</i>	<i>90,2</i>	<i>81,2</i>	<i>71,9</i>	<i>94,45</i>	<i>4,3</i>	<i>0,1</i>	<i>1,0</i>	<i>n.d</i>	<i>0,4</i>

\*. porcentaje de xilo-oligosacáridos contenidos en la fracción líquida

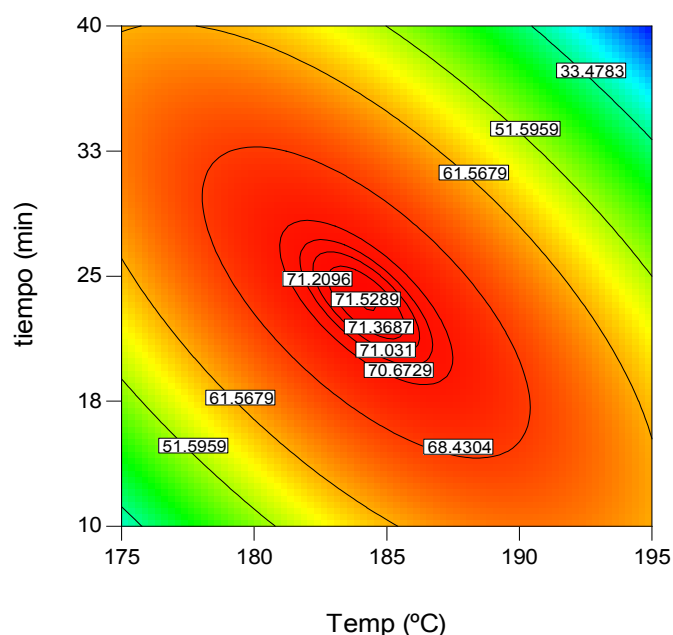
n.d: no detectado

Para describir la variación producida en la RAH en la fracción líquida, como consecuencia del efecto de la temperatura y el tiempo, se eligió un modelo cuadrático por ser el que mejor se ajustaba a los datos experimentales, como confirman los parámetros de regresión obtenidos;  $R^2$  ajustado = 0,98,  $R^2$  predicho = 0,94, p-valor del test falta de ajuste = 0,12 (no significativo, Anexo I). Dicha variación vino definida por la siguiente ecuación:

$$\% \text{RAH} = 71.12 - 4.46 T - 4.70 t - 20.31 Tt - 15.06 T^2 - 14.88 t^2 \quad (2)$$

siendo “T” la temperatura y “t” el tiempo.

El gráfico de contorno definido por la ecuación 2, representado en la Figura 74, muestra una clara tendencia hacia un valor máximo de RAH, dentro del rango experimental estudiado. Concretamente, la condición experimental óptima proporcionada por el diseño, donde se alcanza una máxima recuperación de azúcares hemicelulósicos, fue **184 °C y 24 min**, obteniéndose un **71,6% de RAH** respecto al contenido en la materia prima.



**Figura 74. Gráfico de contorno para la RAH en la fracción líquida obtenida en la primera etapa de pretratamiento**

La optimización de la RAH en el PACL de la paja de trigo en la primera etapa de una configuración de pretratamiento en dos etapas, conduce a un valor de RAH que puede considerarse elevado si se compara con otros resultados descritos en la bibliografía. Así, por ejemplo, en un residuo herbáceo como el bagazo de maíz, Liu y Wyman (2005) alcanzaron un 47% de RAH en la fracción líquida originada tras el PACL a 200 °C y 20 min. Palmarola-

Adrados y *col.* (2005), en un estudio comparativo de varios pretratamientos sobre el salvado de trigo, obtuvieron un máximo de 58% de pentosas cuando sometieron la biomasa a la acción del agua caliente líquida en las condiciones de 170 °C y 30 min. En otro tipo de material lignocelulósico como la madera de chopo, Negro y *col.* (2003a), utilizando el mismo reactor de pretratamiento que en este trabajo, encontraron porcentajes de recuperación del 65% tras pretratar a 210 °C y 5 min. Sin embargo, Allen y *col.* (2001) al utilizar una configuración de PACL en contracorriente consiguieron elevar los rendimientos de recuperación de pentosas hasta el 80%, en fibra de maíz pretratada a 215 °C y 5 min. Estos resultados se pueden explicar considerando que en la configuración en contracorriente, los azúcares hemicelulósicos van siendo retirados del medio a medida que se solubilizan en la fracción líquida, lo que evita su degradación y permite obtener elevadas RAH. Sreenath y *col.* (1999), al tratar la fibra de alfalfa mediante agua caliente líquida en contracorriente a 220 °C y 2 min, alcanzó también buenos rendimientos de recuperación de azúcares hemicelulósicos del 67%.

#### 4.2.3.1.1 Verificación de la condición óptima

Una vez obtenida la condición óptima de experimentación predicha por el diseño de experimentos se realizó la experiencia a 184 °C y 24 min, con el fin de verificar los resultados experimentalmente. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Composición del residuo sólido insoluble, recuperación de azúcares en la fracción líquida y eficacia de sacarificación del RSI (g glucosa / 100 g glucosa en RSI) tras la primera etapa del pretratamiento de la paja de trigo en dos etapas, realizada a 184 °C y 24 min.**

<b>RSI (A)</b> <b>(% bps)</b>			<b>Recuperación de azúcares en</b> <b>fracción líquida A</b> <b>(g azúcar/100 g azúcar en materia prima)</b>				<b>% ES</b>			
<i>Celulosa</i>	<i>Xilano</i>	<i>Lignina</i>	<i>Glucosa</i>		<i>Xilosa</i>		<i>Glucosa</i>		<i>Xilosa</i>	
			<i>Obtenida</i>	<i>Predicha</i>	<i>Obtenida</i>	<i>Predicha</i>	<i>Obtenida</i>	<i>Predicha</i>	<i>Obtenida</i>	<i>Predicha</i>
55.1	7.5	25.1	5,6*	6,5 (5,5-7,5)	70,9*	71,6 (68,5-74,7)	56.7*	ndt	41.9*	ndt

ndt: no determinado

\*: valor medio del triplicado ( $\delta < 2\%$ )

Como se puede apreciar, los valores experimentales concuerdan con los valores predichos por el diseño de experimentos (para un intervalo de confianza del 95%). El porcentaje de recuperación de sólidos obtenido, en esta primera etapa de pretratamiento, fue del 67%. La RAH obtenida experimentalmente fue del 70,9%, un valor muy similar al predicho. La determinación de la concentración de compuestos potencialmente inhibidores contenidos en esta fracción arrojó los siguientes resultados: ácido acético, 0,7 g/l, furfural, 0,18 g/l, 5-HMF, 0,04 g/l y ácido fórmico, 0,23 g/l.

La fracción líquida enriquecida en azúcares hemicelulósicos generada tras el PACL de la paja de trigo en la primera etapa de pretratamiento se podría utilizar para la transformación de los azúcares a etanol, tras una etapa de hidrólisis ácida o enzimática de los oligómeros contenidos en la misma. Esta aplicación requeriría un estudio de la fermentabilidad de dicha fracción, con el objetivo de conocer el potencial de inhibición de los compuestos de degradación generados en el pretratamiento. No obstante, a la luz de los resultados de las pruebas de fermentabilidad realizadas en el material pretratado a 188 °C y 40 min (véase más adelante en el apartado 4.3.1), donde la concentración de inhibidores fue superior a la encontrada aquí para la FL a 184 °C y 24 min, se puede inferir que la fermentación de dicha fracción sería factible.

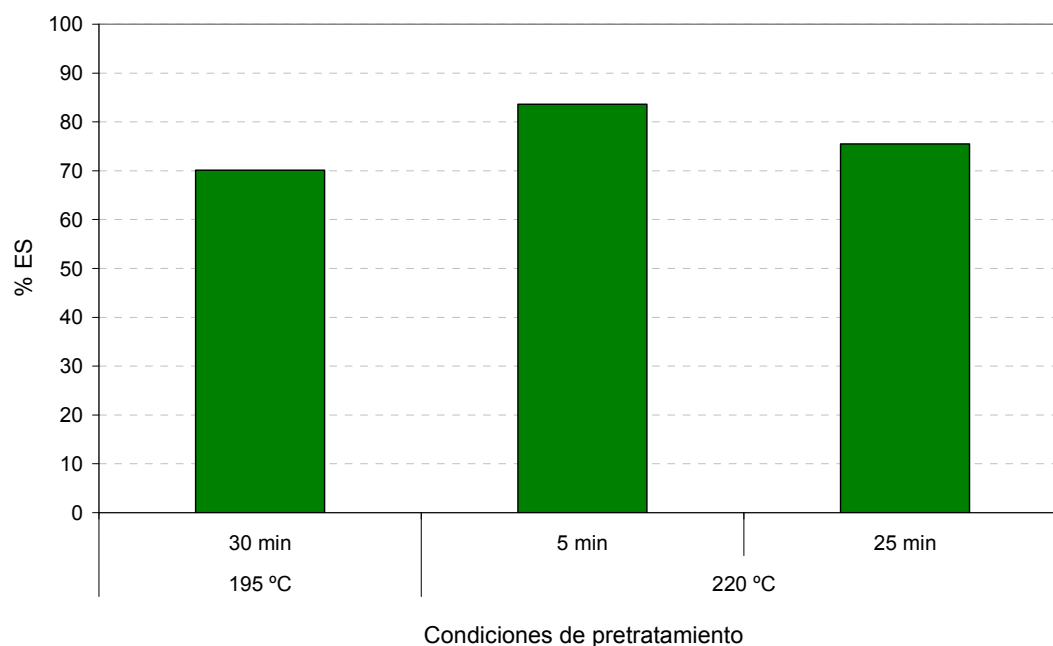
Por otra parte, y puesto que en esta FL la mayoría de los carbohidratos son xilo-oligosacáridos, se podría plantear su utilización con otros fines distintos a la producción de etanol, como es su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Alcida (2006) evaluó la actividad antioxidante de diferentes oligosacáridos obtenidos en el pretratamiento de varios residuos agrícolas, entre ellos la paja de trigo, encontrando que presentaban una actividad oxidante en algunos casos más alta que muchos frutos naturales, lo que hace a estos compuestos candidatos potenciales para su uso como aditivos alimentarios. En el mismo estudio se encontró que los oligosacáridos hemicelulósicos analizados poseen actividad tanto mitogénica como comitogénica. Asimismo, se observaron propiedades inmunogénicas en los arabino-glucuronoxilanos obtenidos del residuo del procesado del maíz y la paja de trigo.

#### 4.2.3.2 Segunda Etapa de pretratamiento

La segunda etapa del pretratamiento se planteó con el objetivo de obtener un residuo con una alta digestibilidad enzimática a partir de un material previamente pretratado. Para ello, se utilizó como sustrato el residuo sólido insoluble originado en la primera etapa del pretratamiento (RSI A), conforme al esquema de la Figura 71. Este residuo contenía principalmente celulosa (60,8%) y lignina (25,1%) y pequeñas cantidades de xilano (8,1%) y arabinano (1,5%). La mayor cantidad de arabinosa y toda la galactosa fueron solubilizadas durante la primera etapa del pretratamiento. Tras la segunda etapa de pretratamiento se obtuvo un residuo pretratado que, como en anteriores experimentos, se separó en una fracción líquida (FL 2) y un residuo sólido insoluble (RSI B), en el que se determinaron los parámetros para el cálculo de las variables respuesta.

Para establecer el intervalo experimental de la segunda etapa de pretratamiento se realizó un estudio preliminar con el propósito de acotar la región experimental del nuevo diseño de experimentos. Para ello, el RSI (A) se sometió a una serie de ensayos de pretratamiento a temperaturas de 195 y 220 °C y tiempos de residencia entre 5 y 25 min, cuyos resultados se muestran en la Figura 75.





**Figura 75. Resultados del estudio preliminar de eficacia de sacarificación (ES) realizado sobre el RSI (A), con el objetivo de determinar la región experimental de optimización de esta variable.**

Los datos mostrados en esta figura sugieren que el rango experimental donde encontrar una condición óptima de pretratamiento del RSI (A) con el objetivo de maximizar la liberación de glucosa por hidrólisis enzimática, sería alrededor de 220 °C y 5 min. Basándonos en estos resultados, se construyó un nuevo diseño (**Diseño 4**) de composición central,  $2^2$ , en el intervalo de 200-240 °C de temperatura y 3-15 min de tiempo. Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 14.

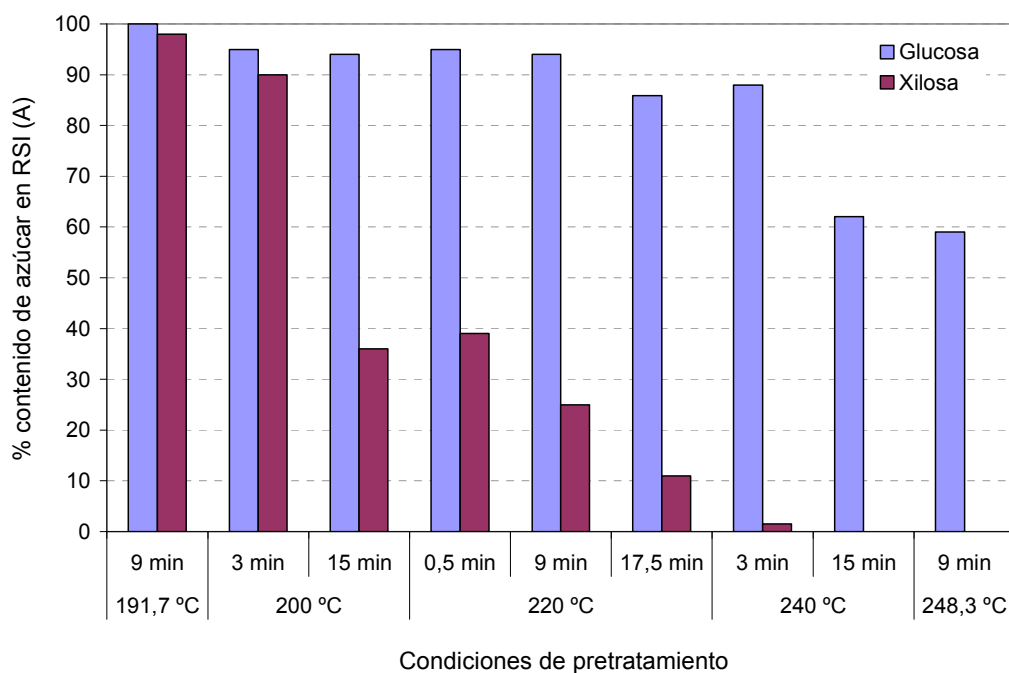
Tabla 14. Porcentaje de recuperación de sólidos, composición del RSI (B), recuperación de azúcares en la fracción líquida e índices de hidrólisis enzimática [ES, en g glucosa/100 g glucosa potencial en RSI (B) y RHE, en g glucosa/100 g glucosa potencial en materia prima], obtenidos tras la segunda etapa de pretratamiento de la paja de trigo conforme a las condiciones del diseño de experimentos 4

Experiencias (Diseño 4)		% RS	Composición RSI (B) (% bps)				Recuperación de azúcares en fracción líquida (B) g / 100 g azúcar en RSI (A)			Índices de hidrólisis enzimática	
°C	min		Celulosa	Xilano	Lignina	Glucosa	Xilosa	% ES	% RHE		
200	3	85,1	61,2	3,8	18,7	0,4	3,6	71,7	67,1		
240	3	81,4	58,4	0,0	22,9	1,8	0,3	81,0	69,2		
200	15	85,1	61,7	0,0	27,8	0,7	2,9	78,7	74,3		
240	15	70,6	46,7	0,0	27,9	1,9	0,0	99,8	59,1		
191,7	9	88,9	63,0	5,2	21,8	0,4	2,3	64,2	63,6		
248,3	9	71,1	43,8	0,0	29,6	1,7	0,0	94,9	53,1		
220	0,5	91,0	60,3	0,0	28,0	0,8	3,1	87,9	86,6		
220	17,5	82,5	56,2	0,0	29,8	1,2	0,9	88,2	73,5		
220	9	89,7	61,7	0,0	27,4	1,1	2,0	85,8	85,3		
220	9	90,0	61,5	0,0	27,8	1,1	1,9	84,8	84,4		
220	9	90,0	62,4	0,0	27,6	1,0	2,2	83,9	83,4		

En primer lugar, se analizó la composición de los distintos RSI (B) y fracciones líquidas obtenidas tras esta segunda etapa de pretratamiento. Como se puede observar, en la mayoría de las condiciones se obtuvo un RSI (B) compuesto principalmente de celulosa y lignina. En las condiciones menos severas, la concentración de celulosa fue ligeramente superior a la del residuo de partida (RSI A: 60,8% bps), con un máximo de 63% bps. Si se compara este dato con la composición del residuo obtenido en una única etapa de pretratamiento (Tabla 9), se observa que la máxima concentración de celulosa del RSI es similar en ambas configuraciones de pretratamiento, si bien esta se alcanza a distintas condiciones de temperatura y tiempo. El pretratamiento en una etapa requiere temperaturas de 220 °C y tiempos de 20 min para alcanzar una concentración de celulosa en RSI de alrededor de 64% bps, mientras que el tratamiento en dos etapas permite alcanzar estos valores a temperaturas cercanas a los 190 °C y 10 min en la segunda etapa. En el RSI (B) tras el doble pretratamiento solamente se encontraron pequeñas cantidades de xilano en las condiciones menos severas, un 3,8% (bps) a 200 °C y 3 min, y un 5,2% (bps) a 191,7 °C y 9 min.

Respecto a la recuperación de sólidos tras esta segunda etapa de pretratamiento, los valores oscilaron entre el 71 y el 91%, dependiendo de las condiciones experimentales. Como era de esperar, un incremento de la temperatura y el tiempo de residencia dio lugar a una mayor solubilización de componentes, aunque no tan acentuada como en la primera etapa. Este hecho es debido a que la mayoría de los componentes no estructurales que forman parte de la materia prima, ya se habían solubilizado durante la primera etapa.

Tras esta segunda etapa del doble pretratamiento, se calculó la recuperación de glucosa y xilosa considerando la cantidad de azúcares recuperados en ambas fracciones, sólida y líquida, referida al contenido de estos azúcares en el RIS (A). Este parámetro da una idea de la recuperación de azúcares sólo en la segunda fase, en la que el RSI (A) es el sustrato de partida. Solamente se calculó para glucosa y xilosa, puesto que no se encontró arabinosa ni galactosa en las fracciones sólida y líquida en ninguna condición experimental ensayada. Los resultados se muestran en la Figura 76.



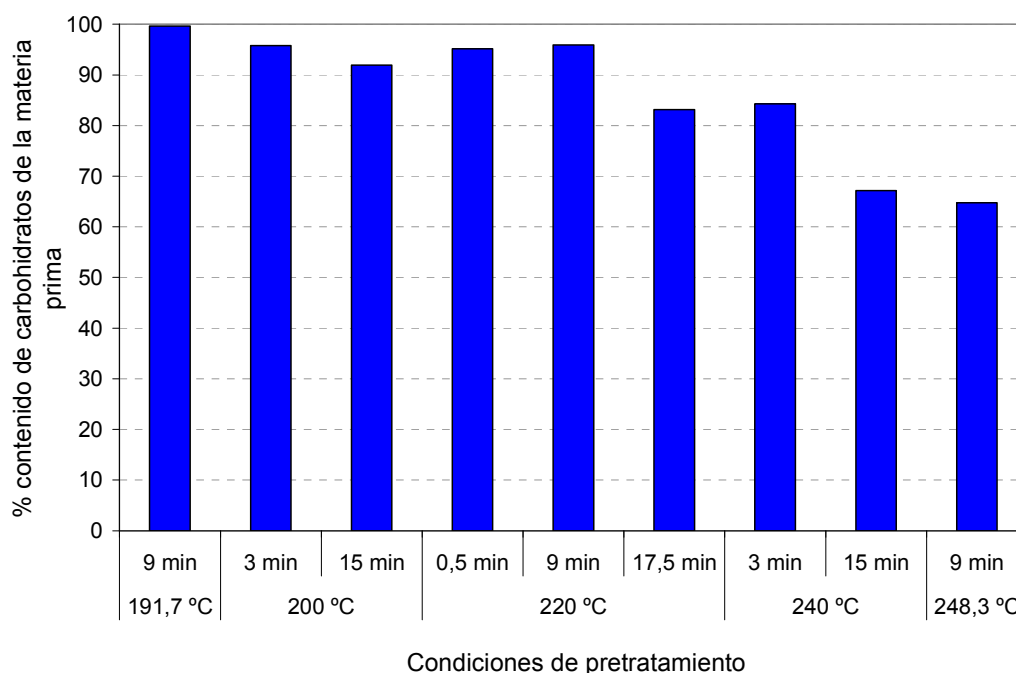
**Figura 76. Recuperación de glucosa y xilosa en las fracciones sólida y líquida [(expresado como un porcentaje del contenido de azúcar en RIS (A)] obtenidas tras la segunda etapa de pretratamiento**

En relación a la glucosa, se puede observar como los porcentajes de recuperación, variaron entre 59,1%, a 248,3 °C y 9 min, y 100% a 191,7 °C y 9 min, lo que corresponde a 35,9 y 60,8 g glucosa/100 g de RIS (A), respectivamente. Solo pequeñas cantidades de este azúcar, <3,2%, se solubilizaron en la fracción líquida (FL 2), coincidiendo con las condiciones de pretratamiento más severas.

En lo que respecta a la xilosa, los valores de recuperación fueron altamente dependientes de los valores de temperatura y tiempo empleados (Figura 76). En las condiciones de pretratamiento menos severas, 191,7 °C y 9 min y 200 °C y 3 min, la mayor parte de la xilosa contenida en el RIS (A) fue recuperada, obteniéndose valores de 89,9% y 98,7%, respectivamente. Cuando la severidad aumenta, se produce una progresiva disminución de este índice hasta llegar a la ausencia de xilosa en el RIS y la fracción líquida a partir de 240 °C y 3 min. En ningún caso, la cantidad de xilosa supone una contribución relevante al total de azúcares recuperados, ya que el RIS (A) de partida solo contenía un 8% bps de xilano.

Cuando estos valores de recuperación se refieren al contenido del azúcar en la materia prima, hay que considerar la cantidad de éstos en la fracción líquida de la primera etapa (FL 1), en la fracción líquida de la segunda etapa (FL 2) y en el RIS (B).

En la Figura 77 se representa la recuperación total de los azúcares en las dos etapas, considerando la suma de glucosa y azúcares hemicelulósicos, referida al contenido total de carbohidratos de la materia prima.



**Figura 77. Recuperación de glucosa y azúcares derivados de hemicelulosa tras el pretratamiento en dos etapas, expresado en base al contenido en la materia prima**

Como se puede apreciar, la recuperación de carbohidratos es muy elevada (95-100%) hasta la condición experimental de 220 °C y 9 min, a partir de la cual empieza a decrecer a consecuencia de la severidad de las condiciones de pretratamiento, que dan lugar a una mayor degradación de azúcares en productos de más bajo peso molecular.

#### *4.2.3.2.1 Optimización de la digestibilidad enzimática de la celulosa en el RSI (B)*

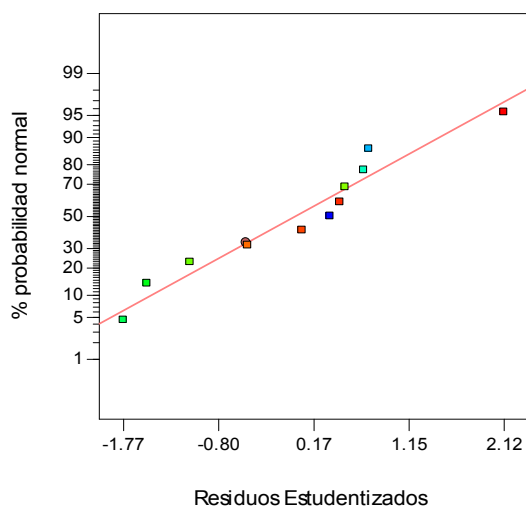
Como se muestra en la Tabla 14, los porcentajes de ES alcanzados en los RSI tras la segunda etapa de pretratamiento muestran valores elevados entre el 80 y 99% respecto al teórico, en la mayoría de las condiciones experimentales. Únicamente en las condiciones experimentales menos severas, 191,7 °C y 9 min y 200 °C y 3 min, donde todavía existe una cierta cantidad de xilano en el RSI (B), la eficacia de sacarificación alcanza valores del 64,2 y 71,7% del teórico, respectivamente.

Cabe destacar que los valores de ES alcanzados muestran una tendencia creciente en todo el rango de condiciones ensayado. Incluso a partir de 200 °C y 15 minutos, donde ya se no encuentra xilano en el RSI (B), los valores de ES siguen aumentando conforme se incrementan

las condiciones de tiempo y temperatura. Estos resultados difieren de los obtenidos en el pretratamiento en una etapa, donde se producía un descenso en los valores de ES a elevadas temperaturas de 220 °C y largos tiempos de residencia en el reactor (20 y 40 min). El hecho de utilizar una configuración de pretratamiento en dos etapas, permite separar en la primera etapa una gran parte del xilano de la materia prima, y utilizar en la segunda etapa un sustrato con una baja concentración de este componente. La retirada de una gran parte de este componente evitaría las posibles reacciones de condensación con la lignina (Chandra y *col.*, 2007), a las que se atribuyen los descensos en los valores de ES en el pretratamiento en una etapa. Por otra parte, al utilizar un residuo con una baja concentración de xilano, se hace más efectiva la acción físico-química del efecto combinado de los factores temperatura y tiempo sobre la celulosa, reduciendo la cristalinidad de este polímero y mejorando la accesibilidad de la enzimas hacia sitios específicos que serían inaccesibles antes de la segunda etapa de pretratamiento (Ragauskas y *col.*, 2006; Angenent, 2007).

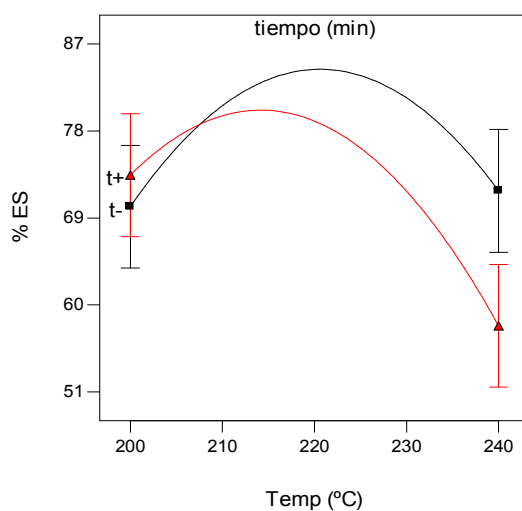
No obstante, hay que tener en cuenta el efecto que la temperatura y el tiempo ejercen sobre el RIS (A) durante esta segunda etapa de pretratamiento en cuanto a la recuperación de celulosa, ya que se produce una cierta solubilización de este componente en las condiciones más severas. Este hecho se puede apreciar a 240 °C y 15 min y 248,3 °C y 9 min, donde se alcanzan los mayores porcentajes en ES, 99,8% y 94,9%, respectivamente, pero también se producen las mayores pérdidas de material, 70,6 y 71,1%, durante esta etapa. Es en estas condiciones donde se producen las recuperaciones más baja de glucosa (ver Figura 76), 63 y 59,1 %, respectivamente. Ello da como resultado que los valores de la variable RHE, en estas dos condiciones mencionadas, difieran significativamente de los de ES, descendiendo hasta el 59,1% y el 53,1%, respectivamente. Por esta razón, con el fin de encontrar una condición experimental óptima donde además de obtener un elevado valor de ES sobre el RIS B, no se produzcan elevadas pérdidas de material, se decidió optimizar la variable RHE, que representa la glucosa obtenida mediante hidrólisis enzimática del RIS B, referida al contenido de este azúcar en la materia prima. De esta manera, se tienen en cuenta las pérdidas de material ocurridas tanto en la primera como en la segunda etapa del pretratamiento, un aspecto a considerar de cara a mejorar el balance global del proceso.

Los resultados del rendimiento en hidrólisis enzimática (RHE) obtenidos sobre el RIS (B) que se muestran en la Tabla 14, se analizaron estadísticamente mediante el programa Design Expert 7.0.0 El modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue un modelo cuadrático, caracterizado por los parámetros de regresión;  $R^2$  ajustado = 0,97,  $R^2$  predicho = 0,94 y “test de falta de ajuste” = 0,088, que estaba por encima del nivel de significación establecido del 0.05. Estos valores, junto con el gráfico de probabilidad normal de los residuos (Figura 78), permiten explorar la región experimental sin riesgo de cometer errores predictivos.



**Figura 78. Gráfico de probabilidad normal de los residuos estudentizados internamente para el modelo matemático utilizados en la optimización del rendimiento de hidrólisis enzimática del RSI (B) obtenido en la segunda etapa del pretratamiento**

Los valores de RHE están determinados por la interacción existente entre los factores temperatura y tiempo de residencia (Figura 79), que mostró un p-valor por debajo del nivel de significación establecido ( $p < 0.05$ ) (Anexo I).



**Figura 79. Gráfico de interacción entre los factores temperatura y tiempo de residencia, para el rendimiento de HE. Siendo t+ el nivel alto del tiempo (15 min) y t- el nivel bajo del tiempo (3 min)**

A elevadas temperaturas, 240 °C, el tiempo de residencia mostró un mayor efecto sobre los valores de RHE, que descienden desde 69,2% a 3 min hasta 59,1% a 15 min, que a bajas

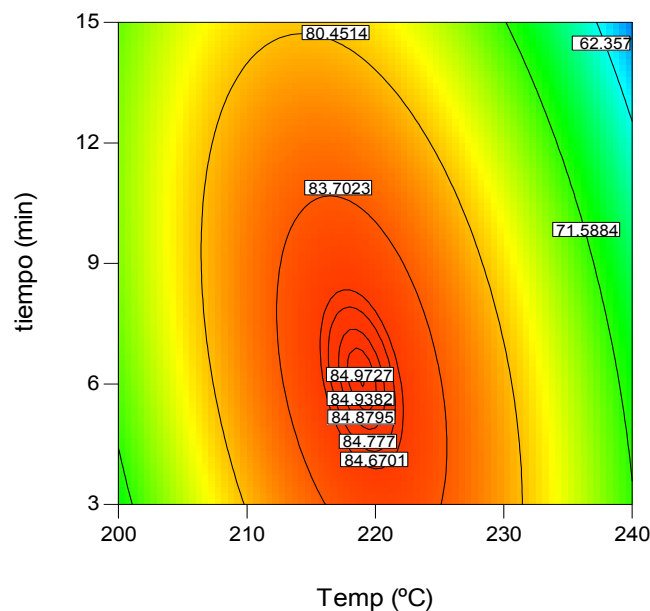
temperaturas, 200 °C, donde el rendimiento en hidrólisis enzimática incrementa desde 67,7% a 3 min hasta 74,3% a 15 min. En lo que respecta a la temperatura, un ascenso desde 200 hasta 240 °C, considerando todos los niveles del factor tiempo, da lugar a una curvatura en la región experimental que genera una región de valores máximos para esta variable entre 210 y 220 °C. En conclusión, y como ya ocurrió durante el pretratamiento en una etapa, los valores de RHE del material pretratado presentan una dependencia simultánea de los factores temperatura y tiempo.

En base a estos resultados, se estableció la ecuación que define el efecto de la temperatura y el tiempo sobre los valores de RHE:

$$\% RHE = 84,2 - 3,5T - 2,6t + 4,3Tt - 13,4T^2 - 2,5t^2 \quad (3)$$

siendo “T” la temperatura y “t” el tiempo.

El buen ajuste del modelo matemático a los datos experimentales permitió establecer un valor óptimo para RHE dentro del rango experimental estudiado. El gráfico de contorno definido por la ecuación 3, representado en la Figura 80, muestra una clara tendencia hacia un valor máximo de esta variable, en torno a 215-225 °C y 4-8 min. La condición experimental óptima ajustada por el DEE fue **219 °C y 6 min** donde se obtiene un valor predicho para la eficacia de sacarificación de **85,7%**, y para el RHE del **84,8%**.



**Figura 80. Gráfico de contorno para el RHE obtenido sobre el RSI (B) en la segunda etapa del pretratamiento.**



Este valor se puede comparar con el obtenido en la optimización del pretratamiento en una etapa enfocada a maximizar solo la digestibilidad enzimática del residuo pretratado (apdo.: 4.2.2.2). En ese caso la condición experimental óptima fue 214 °C y 2,7 min y se obtuvo un valor de ES del 91% del teórico, y un RHE del 85%. Al comparar ambas configuraciones de proceso, se observa que las condiciones experimentales óptimas se encuentran en el mismo rango de severidad y que los resultados de ES y RHE son similares. Sin embargo, el pretratamiento en dos etapas permite disponer de una fracción líquida (FL 1), rica en azúcares hemicelulósicos, que podría utilizarse dentro del proceso global de producción de etanol. Desde el punto de vista económico, resulta esencial que tanto las hexosas (glucosa, galactosa) como las pentosas (xilosa, arabinosa) presentes en la biomasa lignocelulósica puedan ser co-fermentadas a etanol, en un mismo proceso (Sedlack y Ho, 2004; Olsson y *col.*, 2006). Para ello, en la paja de trigo sería necesario un pretratamiento en dos etapas que permitiera maximizar el rendimiento global de azúcares potencialmente fermentables a etanol.

#### 4.2.3.2.2 Verificación de la condición óptima

Una vez establecida la condición experimental donde encontrar un óptimo valor de RHE sobre el RIS (B), tras el pretratamiento en dos etapas, se llevó a cabo una verificación de los valores predichos frente a los resultados experimentales. Para este fin, se realizó la segunda etapa del pretratamiento en dos etapas sobre el RSI (A) a 219 °C de temperatura y 6 minutos de tiempo (por triplicado). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Composición del residuo sólido insoluble (RSI B), recuperación de azúcares en la fracción líquida (FL 2) e índices de hidrólisis enzimática (ES, en g glucosa/100 g glucosa potencial en RSI (B) y RHE, en g glucosa/100 g glucosa potencial en materia prima), en la condición óptima para la segunda etapa de pretratamiento del pretratamiento en dos etapas.**

RSI (B) (% bps)			Fracción Líquida 2 [g/100 g RIS (A)]				% ES		% RHE	
Celulosa	Xilano	Lignina	Glucosa		Xilosa		Glucosa			
			Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha	Obtenida	Predicha
59,9	0	21,9	0,2	ndt	1,7	ndt	86,3*	85 (83,2-86,8)	84,7*	83,6 (82-85,2)

\*: valor medio del triplicado ( $\delta < 2\%$ )

ndt: no determinado

Como se puede apreciar en la Tabla 15, en las condiciones óptimas se consigue extraer todo el componente hemicelulósico del RIS (B). Además, la glucosa solubilizada en la fracción líquida 2 resultó en una cantidad despreciable. El porcentaje de recuperación de sólidos

obtenido en esta condición de pretratamiento respecto al material pretratado RSI (A), fue del 91%. No obstante, cuando este porcentaje se refiere a la materia prima, es decir, se calcula la recuperación de sólidos global después de las dos etapas de pretratamiento, el valor desciende hasta el 61%.

Los resultados de eficacia de sacarificación y RHE en el RSI (B) arrojan valores del 86,3%, y 85,8% del teórico, respectivamente. El valor predicho por el DEE para estas variables fue de 85 y 83,6%, respectivamente. Teniendo en cuenta que la desviación estándar asociada con la predicción fue menor al 4%, en ambos casos, los datos experimentales obtenidos se encontraron en el rango de los predichos por el modelo.

#### **4.2.4 Rendimiento global de azúcares en las configuraciones de pretratamiento óptimas estudiadas**

Con objeto de comparar la eficacia del pretratamiento en las configuraciones de proceso en una y dos etapas, en cuanto a la liberación y recuperación de azúcares en las etapas de pretratamiento e hidrólisis, se calculó el rendimiento global de azúcares en las condiciones óptimas obtenidas en los distintos planteamientos experimentales (Figura 81), es decir:

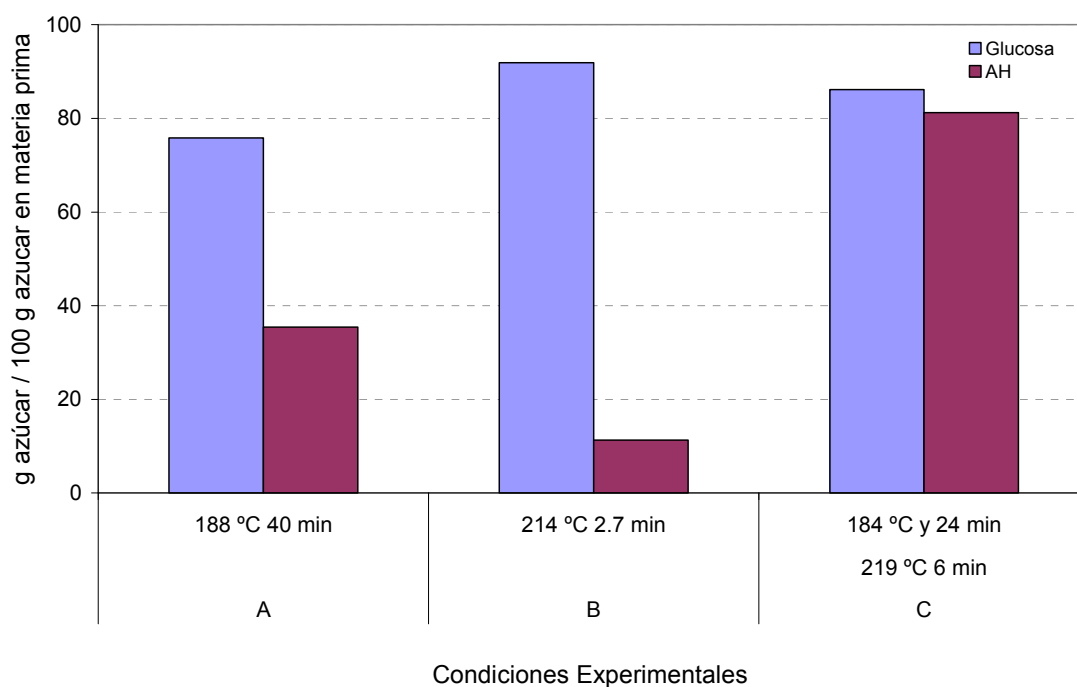
- Pretratamiento en una etapa

A) Optimización de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la FL y de la liberación de glucosa por HE del RSI

B) Optimización de la liberación de glucosa por HE del RSI

- Pretratamiento en dos etapas

C) *Primera etapa:* Optimización de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la FL. *Segunda etapa:* Optimización de la liberación de glucosa por HE en el RSI obtenido en la primera etapa de pretratamiento



**Figura 81. Rendimiento global de azúcares fermentables a etanol en las condiciones experimentales óptimas obtenidas en las distintas configuraciones de pretratamiento. A y B: Pretratamiento en una etapa y C, pretratamiento en dos etapas. AH: azúcares hemicelulósicos**

Los resultados se muestran en la Figura 81, en referencia a los pretratamientos A, B y C, cuyos objetivos se mencionan arriba en el párrafo anterior. Como se puede observar, en el doble pretratamiento, C, se obtienen valores de recuperación del 86% para la glucosa y del 81% para la xilosa. En ninguna de las condiciones experimentales óptimas para el pretratamiento en una etapa, A o B, se obtiene una recuperación global tan alta de ambos azúcares. Dentro del pretratamiento en una etapa, la configuración de proceso en la cual se recuperó más cantidad de azúcares fue 188 °C y 40 min, donde se obtuvo un 75,8% y un 35,5% para la glucosa y azúcares derivados de hemicelulosa, respectivamente. Por el contrario, a 214 °C y 2,7 min se alcanza una recuperación global de glucosa del 91,8%, aunque el valor obtenido para los azúcares derivados de hemicelulosa desciende hasta el 11,31%, debido a la degradación que éstos sufren a consecuencia de la severidad de esta condición experimental.

La utilización de un doble pretratamiento con el objetivo de mejorar la digestibilidad enzimática para la producción de etanol también ha sido estudiada por Söderström y *col.* (2002), en madera de abeto rojo sometida a un doble pretratamiento mediante explosión por vapor. La optimización de este proceso se ensayó en un rango de temperaturas de entre 180 y 220 °C y 2 a 10 min para el factor tiempo. En ambas etapas, el residuo a pretratar fue impregnado con SO<sub>2</sub>

[3% (p/p)]. Las condiciones óptimas encontradas fueron 190 °C y 2 min, para la primera etapa, y 210 °C y 5 min para la segunda. Puesto que el sustrato es una madera blanda, cuyo componente hemicelulósico mayoritario es un polímero de manosa, el objetivo fue recuperar la mayor parte de este azúcar en la FL, para posteriormente maximizar la liberación de glucosa en el sustrato doblemente pretratado. Los resultados muestran un rendimiento global de manosa, en la fracción líquida obtenida tras la primera etapa, del 88% del contenido en materia prima. La glucosa, en cambio, fue principalmente liberada en la etapa de hidrólisis enzimática realizada sobre el residuo obtenido tras la segunda etapa del pretratamiento, alcanzándose un valor máximo de recuperación global del 74% sobre el contenido en materia prima.

La maximización del rendimiento global de azúcares es un objetivo esencial para mejorar la viabilidad económica del proceso de obtención de etanol. Por ello, de las distintas configuraciones de proceso estudiadas en esta investigación, el pretratamiento en dos etapas constituye la opción más adecuada para un máximo aprovechamiento de todos los azúcares potencialmente convertibles a etanol contenidos en la paja de trigo. El potencial de azúcares en la fracción líquida generada en la 1ª etapa del pretratamiento, así como la baja concentración de productos inhibidores contenidos en la misma, hacen de esta fracción una corriente susceptible de utilización en procesos de co-fermentación para la obtención de etanol, que indudablemente contribuiría a mejorar la viabilidad económica del proceso.

### 4.3 ENSAYOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

En este punto de la investigación se realizaron diferentes ensayos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) sobre los materiales pretratados obtenidos en las diferentes condiciones óptimas de pretratamiento de la paja de trigo en una y en dos etapas, con el objetivo de evaluar el potencial de producción de etanol de dichos materiales.

Los ensayos de SFS del pretratamiento en una etapa para la optimización múltiple se realizaron utilizando el residuo pretratado completo. Este residuo completo tiene todos los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica (hexosas y pentosas), pero al no disponer de un microorganismo fermentador de azúcares de 5 y 6 átomos de carbono, se estudió el potencial de producción de etanol sólo a partir de la glucosa contenida en el residuo pretratado completo. Los ensayos de SFS también se realizaron sobre RSI obtenido en la segunda etapa de pretratamiento del pretratamiento en dos fases, y en el RSI del pretratamiento en una etapa para la optimización de la digestibilidad de la celulosa. El microorganismo fermentador utilizado en todos los ensayos de fermentación, fue una cepa de la levadura *Saccharomices cerevisiae*.

#### 4.3.1 Ensayos de SFS sobre el residuo pretratado completo procedente del pretratamiento en una etapa.

Se han realizado diferentes ensayos de SFS sobre el residuo pretratado completo (RP) obtenido tras el pretratamiento de la paja de trigo a 188 °C y 40 min, conforme se describe en el apartado 3.4.2.1.1.

Previamente a los test de SFS, se estudió el efecto que sobre el microorganismo fermentador ejercen los productos que se generan durante la etapa de pretratamiento, y que se encuentran presentes en la fase líquida del residuo pretratado completo. Para ello se evaluó la fermentabilidad de esta fracción líquida.

El tipo y concentración de los compuestos originados durante el pretratamiento va a depender de la materia prima y las condiciones del mismo (temperatura y tiempo de residencia empleados). Todos los compuestos encontrados en la fracción líquida, han sido también identificados en hidrolizados procedentes de otras biomásas herbáceas, como residuo de maíz (Ohgren y *col.*, 2006) y cardo (Ballesteros y *col.*, 2007). En la Tabla 16 se muestra la composición de la fracción líquida contenida en el residuo pretratado en las condiciones óptimas de pretratamiento. En cuanto al contenido en azúcares, la xilosa es el mayoritario, encontrándose en una concentración de 4,2 g/l (7,2 g/100 gramos de materia prima), la concentración de glucosa es 2,2 g/l (1,9 g/100 gramos de la materia prima), y aparecen pequeñas cantidades de galactosa y arabinosa (0,3 y 0,1 g/l respectivamente). El 28% de la xilosa de la materia prima es recuperada en la fracción líquida, mientras que únicamente un 5% de la

glucosa se encuentra en esta fracción. En cuanto a los ácidos y aldehídos detectados en esta fracción, el ácido acético, procedente de la hidrólisis de los grupos acetilo de la fracción hemicelulósica, fue el compuesto mayoritario encontrado, en una concentración de 2,5 g/l. La concentración de ácido fórmico, procedente de la descomposición en condiciones ácidas del furfural e HMF, fue de 0,7 g/l. Puesto que no se detectó ácido levulínico en el prehidrolizado, se podría pensar que el ácido fórmico procede fundamentalmente de la degradación del furfural. La concentración de furfural encontrada fue de 1,2 g/l, procedente principalmente de la degradación de los azúcares procedentes de las hemicelulosas (principalmente xilosa). Esta concentración de furfural se encuentra del orden de lo obtenido por otros autores tras un tratamiento hidrotérmico de la paja de trigo en condiciones severas. Tomás-Pejó y *col.* (2008) tras el pretratamiento mediante explosión por vapor a 210 °C y 5 min de la paja de trigo, obtuvieron un residuo pretratado completo, cuya concentración en furfural fue de 1,4 g/l. Por último, en cuanto a la concentración de HMF, la cantidad encontrada fue de 0,2 g/l, debido a la degradación sufrida por la glucosa y galactosa.

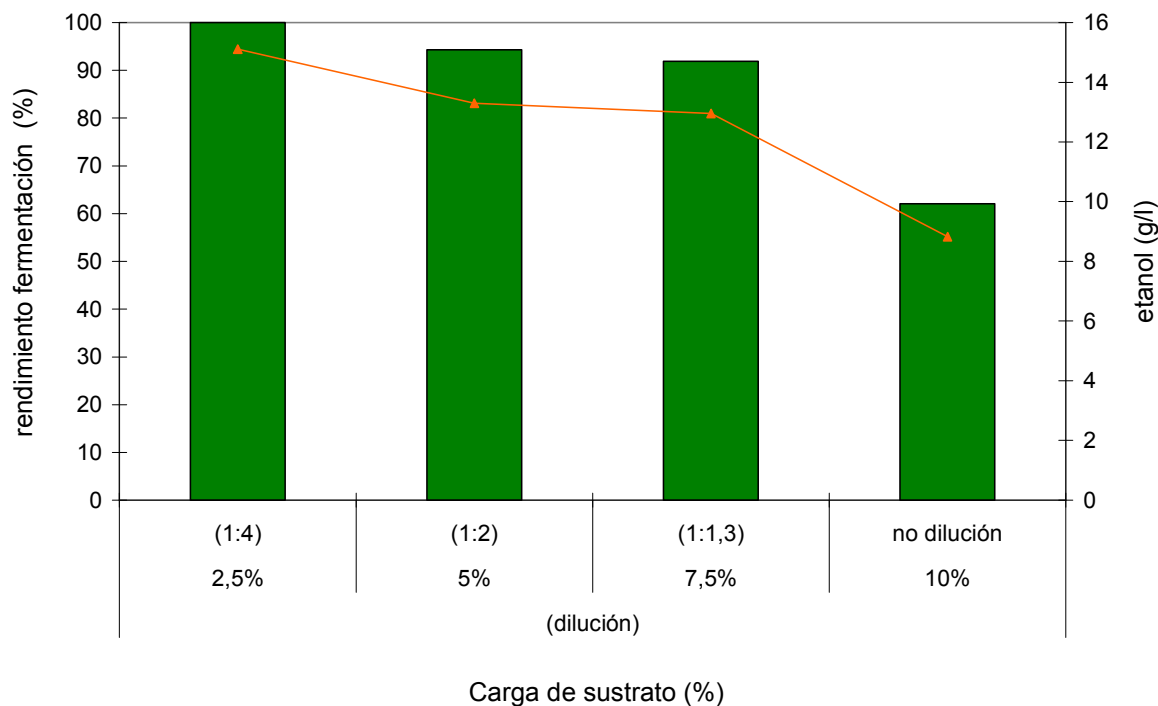
**Tabla 16. Composición de la fracción líquida en el residuo pretratado a 188 °C y 40 min obtenido tras el PACL en una etapa de la paja de trigo**

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (g/l)</i>
<i>Xilosa*</i>	4,2
<i>Glucosa*</i>	2,2
<i>Galactosa*</i>	0,3
<i>Arabinosa*</i>	0,1
<i>Acético</i>	2,5
<i>Furfural</i>	1,2
<i>Fórmico</i>	0,7
<i>5-HMF</i>	0,2

\* concentraciones obtenidas tras una prehidrólisis ácida de la fracción líquida

En general, en los pretratamientos con explosión por vapor se suelen producir mayores pérdidas de productos de degradación debido a la evaporación ocurrida en la fase de despresurización final, que se realiza en este tipo de pretratamiento. En el ACL no existe esta etapa de despresurización, y por lo tanto, se pueden encontrar mayores concentraciones de estos compuestos (Laser y *col.*, 2002). Este hecho se puede observar al comparar las concentraciones antes descritas con las del prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento con explosión por vapor de paja de cebada a 210 °C y 5 min (García-Aparicio y *col.*, 2006), donde se obtuvieron concentraciones de 2,0 y 0,7 g/l de ácido acético y furfural, respectivamente.

Una vez caracterizada la fracción líquida, se evaluó la fermentabilidad de la misma. Para ello se utilizó el medio real y diferentes diluciones de esta fracción (1:1,3, 1:2 y 1:4), que corresponderían a concentraciones de sólidos totales en la mezcla completa del 7,5, 5 y 2,5% (p/p). La concentración máxima de etanol y los rendimientos del proceso obtenidos, a las 72 h, para las distintas diluciones estudiadas, se muestran en la Figura 82.



**Figura 82.** Rendimiento de fermentación y concentración de etanol en el ensayo de fermentabilidad de la fracción líquida contenida en el residuo pretratado a 188 °C y 40 min obtenido tras el pretratamiento en una etapa, utilizando diferentes diluciones: 1:1,3, 1:2 y 1:4.. Debajo se muestra la concentración de sólidos totales a la que equivaldría la dilución en el residuo completo. Rendimientos de proceso de sacarificación y fermentación simultánea (%) (barras) y concentraciones de etanol máximas (g/l) (▲).

Se puede apreciar como en el ensayo realizado a la dilución 1:4, que correspondería a un 2,5% de sólidos totales en el residuo completo, la concentración de los productos generados durante el pretratamiento no produce inhibición alguna sobre el microorganismo fermentador, lo que da lugar a un rendimiento de fermentación del 100% del teórico (considerando un rendimiento de fermentación teórico para este microorganismo del 0,47g etanol/g glucosa). En cambio, en aquellos ensayos realizados a las diluciones 1:2 y 1:1,3 (concentraciones de sólidos totales del 5 y 7,5%) se empieza a observar un cierto efecto tóxico de los compuestos presentes en el medio de fermentación, lo que da lugar a un ligero descenso tanto en los rendimientos de fermentación, 95 y 91% del teórico, como en las concentraciones finales de etanol, 13,3 y 12,9

g/l, respectivamente. Esta inhibición se acentúa en el ensayo realizado sobre el medio sin diluir, que correspondería a un 10% de sólidos totales, donde se aprecia un descenso tanto en la concentración de etanol en el medio (9,0 g/l) como en el rendimiento de fermentación, 62% del teórico.

El efecto inhibitorio producido por los productos generados durante el pretratamiento sobre el proceso de fermentación es un tema abordado con anterioridad por varios autores. Por ejemplo, Klinke y *col.* (2003), tras un pretratamiento mediante oxidación húmeda alcalina de la paja de trigo (195 °C, 10 min, 6,5 g/l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 12 bar de O<sub>2</sub>), estudiaron el efecto de los compuestos generados en este pretratamiento sobre la producción de etanol con *Saccharomices cerevisiae*. Los principales productos encontrados en el hidrolizado obtenido tras el pretratamiento fueron el ácido acético, ácido fórmico y fenoles en una concentración de 1,6, 1,4 y 0,7 g/l, respectivamente. Se comprobó que el hidrolizado no causaba inhibición en la producción de etanol por *S.cerevisiae*, si bien cuando éste se concentró 6 veces, la fermentación tardó 4 horas más que en el hidrolizado sin concentrar. Los autores señalan que esta prolongación del tiempo no podría ser explicada por un efecto inhibitorio de los fenoles solamente, sino que probablemente está causado por interacciones de los fenoles con los ácidos carboxílicos, tales como ácido acético y fórmico.

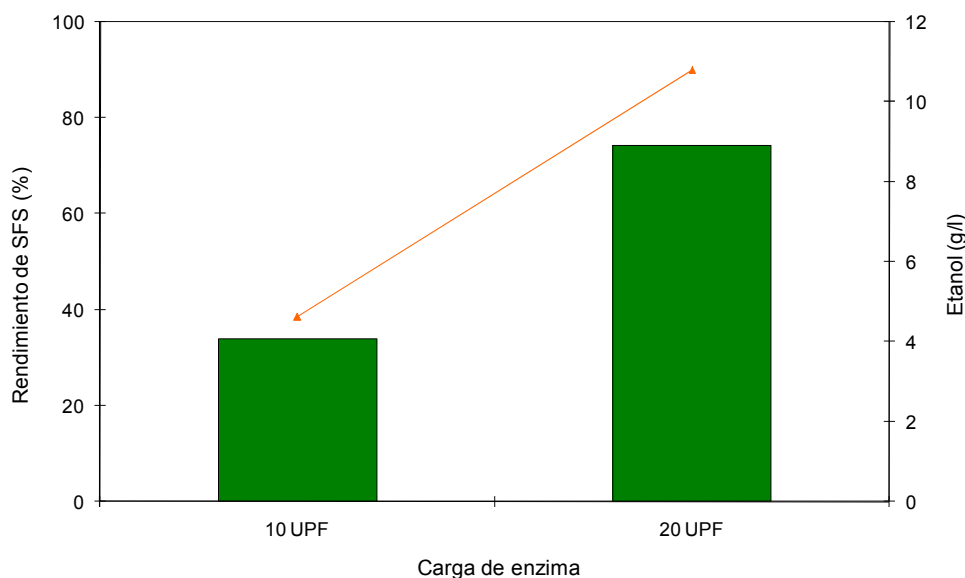
El efecto inhibitorio de los compuestos presentes en la fracción líquida en los ensayos realizados entre el 5 y 10% de carga de sólidos podría deberse al efecto sinérgico de estos compuestos más que a los efectos individuales de cada uno de ellos, de acuerdo a los datos aportados en la bibliografía sobre procesos de fermentación con *Saccharomices cerevisiae*. Se ha descrito que los productos potencialmente inhibitorios en concentraciones del orden de los encontrados en este trabajo no causan efecto inhibitorio cuando se añaden individualmente a un medio de fermentación (Larsson y *col.*, 2000; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). En este sentido, Martín C. y Jönsson (2003) en un estudio sobre el efecto inhibitorio de varios compuestos sobre distintas cepas de *Saccharomices cerevisiae*, observaron que en un medio sintético con concentraciones superiores a 2,3 g/l de ácido acético, 1,75 g/l de ácido fórmico, 1,45 g/l de furfural y 1,6 g/l de HMF, estos compuestos dieron lugar a un descenso de los rendimientos de fermentación (medidos a las 24 h de proceso), debido a su efecto combinado.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Oliva y *col.* (2005) en un estudio sobre la fermentabilidad del material pretratado completo de paja de trigo obtenido tras un pretratamiento por explosión por vapor (220 °C y 3 min). Estos autores observaron que en los ensayos de SFS realizados con una carga de sustrato superior al 8% (p/v), se producía una clara inhibición del microorganismo fermentador, debido a la concentración de los productos de degradación contenidos en la fase líquida del residuo pretratado completo, resultado similar al encontrado en esta investigación, aunque en nuestro caso se utiliza como medio de fermentación la fracción líquida y no el material pretratado completo.



En base a estos datos, y considerando la concentración de sólidos más alta posible donde se produzca el menor efecto de inhibición sobre el microorganismo fermentador, se estableció una carga de sustrato del 7,5% (p/p) para la realización de las posteriores pruebas de SFS, donde la disminución en el rendimiento de fermentación fue inferior al 10%. Un residuo pretratado completo en esta concentración presenta la siguiente composición (% bps): celulosa 42,6%, xilano 2,8%, lignina 20,8% y cenizas 2,8%.

En la Figura 83, se muestra el rendimiento de proceso de SFS y las concentraciones de etanol obtenidas en los ensayos realizados sobre el RP a 188 °C y 40 min con dos cargas de enzima, 10 y 20 UPF/g celulosa. Se aprecia claramente, como el uso de 10 UPF no resulta una carga de enzima eficiente para la producción de etanol a partir de este residuo, obteniéndose un rendimiento de proceso del 33,9%, frente al obtenido cuando se utilizó el doble de carga de enzima, 74,3 % del teórico.



**Figura 83. Efecto de las carga de enzima sobre los rendimientos del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (barras) y las concentraciones de etanol máximas obtenidas (▲)**

Resultados similares fueron obtenidos por Linde y *col.* (2007). Estos autores comprobaron que el aumento de la carga de enzima también mejoró los rendimientos del proceso de sacarificación y fermentación simultánea en un estudio sobre distintas condiciones de proceso de SFS realizado sobre paja de cebada pretratada mediante explosión por vapor (impregnación con 1%  $H_2SO_4$ , 210 °C y 5 min). En aquellos ensayos realizados con una carga de sólidos del 7,5% (p/v), esta autora observó que al incrementar la carga de enzima de 10 a 20 UPF/g celulosa, los rendimiento del proceso aumentaban del 59 al 70%, respectivamente.

#### 4.3.2 Ensayos de SFS sobre los RSI procedentes del pretratamiento en una y dos etapas.

En esta fase de la investigación se realizaron ensayos de SFS utilizando como sustrato los RSI pretratados a 214 °C y 2,7 min, procedente del pretratamiento en una etapa, y a 219 °C y 6 min, procedente del pretratamiento en dos fases [RSI (B)]. Los distintos factores estudiados fueron la carga de sustrato [10 y 12% (p/v)], la adición de xilanasa [5% (v/p) de NS0030] y la carga de celulasas empleada (10 y 20 UPF/g de celulosa). Los RSI utilizados fueron lavados previamente a los ensayos de SFS, para retirar los compuestos inhibidores generados durante el pretratamiento que pueden interferir en el proceso de SFS.

El rendimiento de SFS (% del teórico) y la concentración máxima de etanol alcanzadas a las 96 h, en las distintas configuraciones estudiadas, se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17. Rendimiento de SFS (%) y concentración máxima de etanol (g/l) en los ensayos de SFS realizados sobre los RSI procedentes del pretratamiento en una y dos etapas, con diferentes cargas de enzima (CE: 10 y 20 UPF/g celulosa), carga de sustrato [CS: 10 y 12% (p/v)] y adición de xilanasa (NX: no adición, X: adición)**

<i>Variables de Proceso</i>			<i>RSI a 214 °C 2,7 min</i>		<i>RSI a 219 °C 6 min(DP)</i>	
CE	Adición de Xilanasa	CS	<i>Rendimiento SFS (%)</i>	<i>Etanol (g/l)*</i>	<i>Rendimiento SFS (%)</i>	<i>Etanol (g/l)*</i>
10	NX	10	70,9	18,3	64,7	17,8
		12	57,6	17,9	53,0	17,5
	X	10	80,7	20,9	79,6	21,9
		12	64,1	19,9	65,9	21,7
20	NX	10	86,8	22,5	87,9	24,2
		12	76,5	23,1	72,7	24,0
	X	10	91,6	23,7	90,3	24,8
		12	83,3	25,9	77,9	25,7

\* Los datos representan el valor medio de un triplicado ( $\delta < 4\%$ )

Como se puede apreciar en los datos mostrados en la Tabla 17, el aumento de la carga de sustrato de 10 a 12% (p/v) tiene un efecto negativo en el rendimiento de SFS en todos los ensayos realizados, tanto con diferentes cargas de enzima (10 y 20 UPF/g celulosa) como con la adición de xilanasa. Este efecto se aprecia incluso en las condiciones de mayor carga de celulasas (20 UPF/g celulosa) y adición de xilanasa (X) en los dos RSI ensayados, donde la concentración de etanol es la mayor alcanzada en este ensayo, 23,7 y 24,8 g/l con el 10% y 25,9 y 25,7 g/l con el 12%, para el RSI en una y dos etapas, respectivamente. En estas condiciones, los rendimientos siguen siendo inferiores para la carga de sustrato más elevada, disminuyendo desde el 91,6 y 90,3% en el 10% (p/v) hasta el 83,3 y 77,9% para el 12% (p/v) para el RSI en una y dos etapas, respectivamente. Al aumentar la concentración de sustrato se reduce el

contenido de agua en el medio de fermentación, de modo que se dificulta la homogeneización del material y con ello la difusión de las enzimas (Wyman, 1996), disminuyendo la eficacia de sacarificación del sustrato.

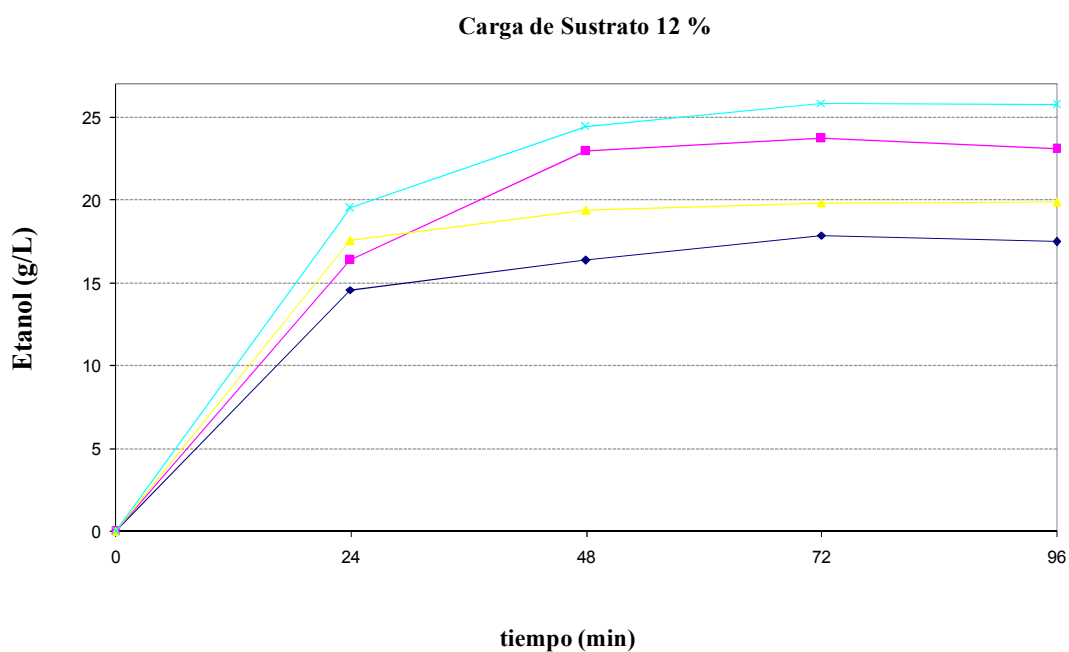
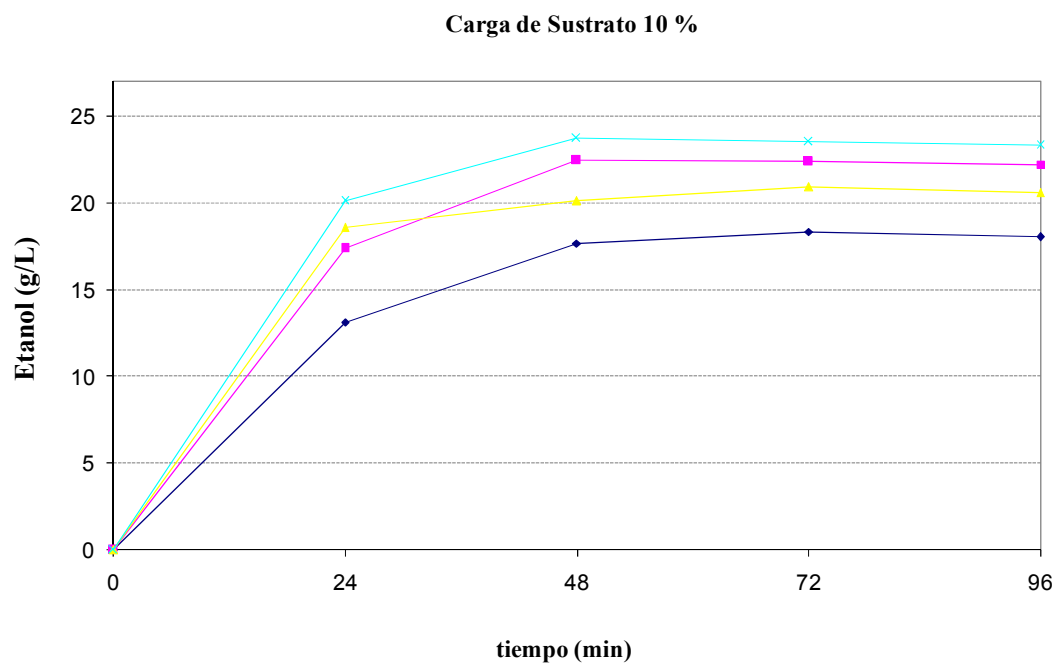
Mohagheghi y *col.* (1992) también observaron una disminución en las concentraciones finales de etanol a medida que aumenta la carga de sustrato, en un estudio sobre la influencia de este factor en un proceso de SFS con *Saccharomices cerevisiae* sobre paja de trigo pretratada mediante ácido sulfúrico diluido (140 °C y 1 h). Estudiando cargas de sólidos entre 7,5 y 20% (w/v), estos autores observaron que concentraciones de sustrato por encima del 12,5% no resultaban en un proceso de SFS eficiente. Así mismo, mediante una estimación de la glucosa liberada, observaron como al aumentar la carga de sustrato disminuía la conversión de celulosa en glucosa durante el proceso de SFS. Evidentemente, una mayor carga de sustrato implica una menor relación sólido/líquido en el medio de SFS, lo que obstaculiza la transferencia de masa aumentando la viscosidad de estos medios. Por otra parte, un mayor contenido en sólidos conlleva una mayor cantidad de lignina en el medio de fermentación, lo que hace que aumente la proporción de sitios inactivos a los que se adsorbe la enzima, disminuyendo los rendimientos de hidrólisis. Este hecho también fue observado por Cara y *col.* (2007), quienes estudiando la influencia de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis enzimática de madera de olivo pretratada mediante PACL, comprobaron que, en un rango entre 2 y 30% (p/v) de sustrato, a medida que se aumentaba el contenido en sólidos del medio de hidrólisis, descendía el rendimiento final del proceso. Los problemas de difusión de la enzima provocaron que en aquellos ensayos realizados con concentraciones de sustrato mayores del 5% los valores en la eficacia de sacarificación fueran menores al 70% del teórico.

Por otro lado, el aumento en la carga de celulasa utilizada en los diferentes ensayos de SFS, de 10 a 20 UPF/g de celulosa, dio lugar a un aumento de los rendimientos de SFS en todas las condiciones probadas, independientemente de la concentración de sustrato y de la adición o no de xilanasas (Tabla 17). Este aumento en los rendimientos da lugar a mayores concentraciones de etanol en el medio de fermentación. Por ejemplo, en el ensayo con 10 UPF, 12% (p/v) de carga de sustrato y adición de xilanasas realizado sobre el RSI obtenido tras el pretratamiento en una etapa, se obtuvo un rendimiento de proceso del 64,1% del teórico (correspondiente a una concentración de etanol de 19,9 g/l), frente a la experiencia realizada con el doble de carga de celulasas, donde se alcanzaron 25,9 g/l de etanol, equivalente a un rendimiento de proceso del 83,3% del teórico.

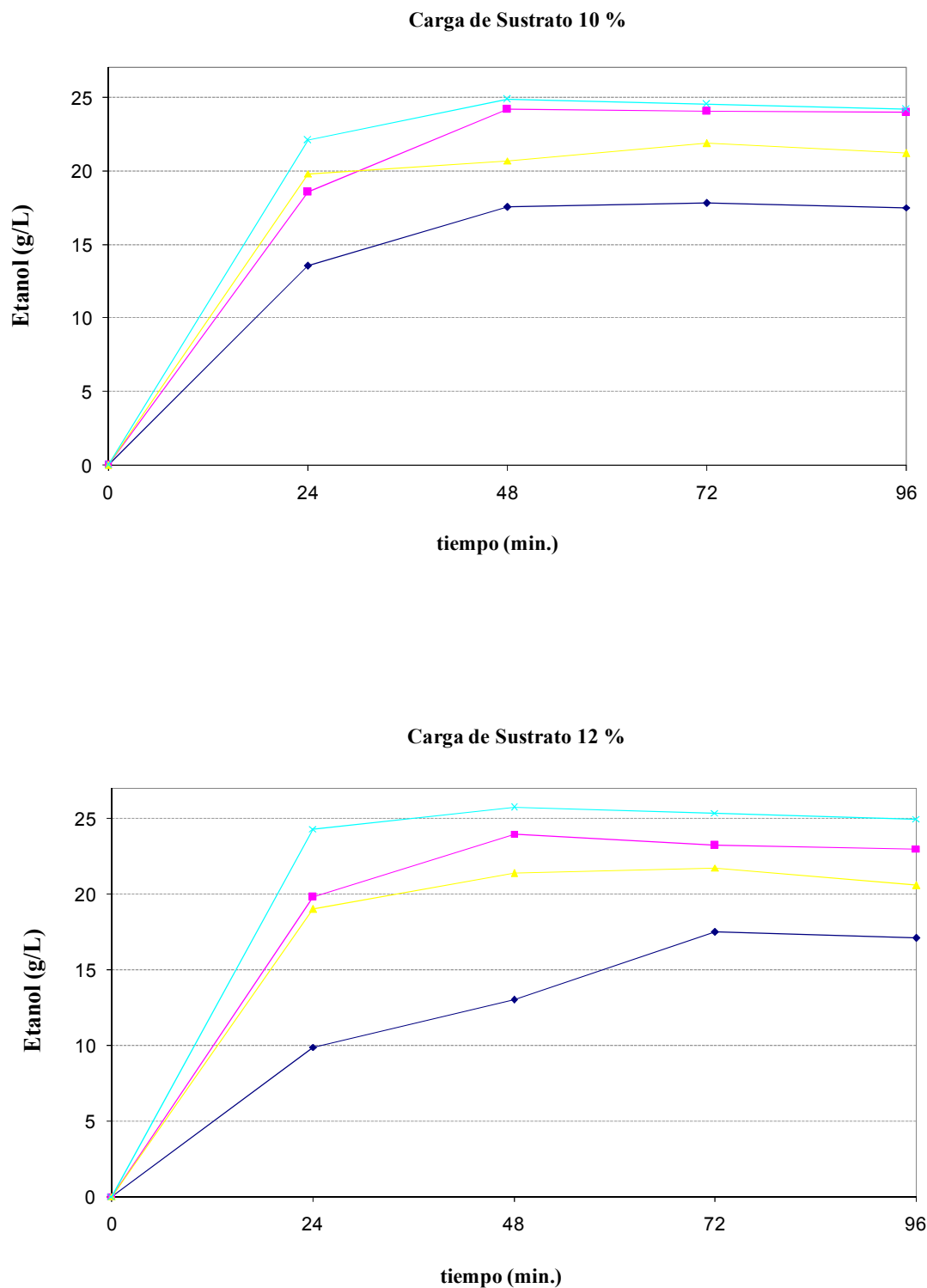
La adición de xilanasas afecta favorablemente al rendimiento en etanol en todas las condiciones ensayadas (Tabla 17), independientemente de la concentración de sustrato utilizada y de la carga de celulasas empleadas. El mayor incremento se observa con el sustrato pretratado a 219°C y 6 minutos (pretratamiento en dos etapas), en la condición experimental de 10 UPF de celulasas y con una carga de sustrato del 10% (p/v), pasando de un 64,7% del teórico (17,8 g/l

de etanol) sin adición de xilanasas, a un 79,6% del teórico (21,9 g/l de etanol) cuando se suplementa el medio con esta enzima.

Con el objetivo de realizar un análisis más detallado de los efectos que la adición de xilanasas tienen sobre los rendimientos y concentraciones finales de etanol, en las Figuras 84 y 85 se representan las cinéticas de SFS de los RSI obtenidos del pretratamiento en una y en dos etapas, respectivamente. Se ha decidido representar los datos en función de la carga de sustrato utilizada (10 y 12%), debido a que la principal diferencia encontrada en torno a este factor radica en la cantidad potencial de glucosa del RSI utilizado, obteniéndose concentraciones finales de etanol similares en ambos casos.



**Figura 84.** Concentración de etanol (g/l) obtenida en el proceso de SFS sobre el RSI pretratado a 214 °C y 2,7 min procedente del pretratamiento en una etapa. Ensayos de SFS correspondientes al 10% (p/v) en A, y al 12% (p/v) en B. ◆ no adición de xilanasa y 10 UPF de celulasas. ■ no adición de xilanasa y 20 UPF de celulasas. ▲ adición de xilanasa y 10 UPF de celulasas. × adición de xilanasa y 20 UPF de celulasas



**Figura 85.** Concentración de etanol (g/l) obtenida en el proceso de SFS sobre el RSI pretratado a 219 °C y 6 min procedente del pretratamiento en dos etapas. Ensayos de SFS correspondientes al 10% (p/v) en A, y al 12% (p/v) en B. ◆ no adición de xilanasas y 10 UPF de celulasas. ■ no adición de xilanasas y 20 UPF de celulasas. ▲ adición de xilanasas y 10 UPF de celulasas. × adición de xilanasas y 20 UPF de celulasas

En las cinéticas de SFS, se puede observar más claramente el efecto que ejercen las xilanasas en el rendimiento del proceso. A tiempos cortos de proceso (24 horas), se observa una considerable diferencia entre aquellas experiencias que no llevaron xilanasas y en las que sí se añadió esta enzima. El efecto de la adición de xilanasas en la producción de etanol es más apreciable en las condiciones de menor carga de enzima (10 UPF), para ambos RSI. Con la carga de sustrato del 10% (p/v), con xilanasas y sin xilanasas se obtienen 18,5 y 13,2 g/l de etanol, para el RSI del pretratamiento en una etapa (Figura 84) y de 19,8 y 13,5 g/l en el RSI del pretratamiento en dos etapas (Figura 85). Este aumento en la concentración de etanol también se observa con la carga de sólidos del 12% (p/v), donde se obtienen 17,5 y 14,6 g/l de etanol en el RSI del pretratamiento en una etapa (Figura 84), y 18,9 y 9,8 g/l en el RSI del doble pretratamiento (Figura 85), en las experiencias con xilanasas y sin xilanasas, respectivamente. Cuando la carga de enzima es de 20 UPF, las diferencias encontradas en las concentraciones de etanol entre la adición o no de xilanasas son menos apreciables. Con la carga de sólidos del 10% (p/v), se obtienen 20,9 y 18,3 g/l de etanol en el RSI pretratamiento en una etapa, y 22,1 y 18,5 g/l en el RSI del doble pretratamiento, en las experiencias con xilanasas y sin xilanasas, respectivamente. Igualmente, con la carga de sólidos del 12%, se obtienen 19,5 y 16,3 g/l de etanol en el RSI del pretratamiento en una etapa, y 24,4 y 19,7 g/l en el del pretratamiento en dos etapas, respectivamente.

Sobre los resultados experimentales obtenidos podemos inferir que la adición de xilanasas contribuye a mejorar la eficacia de sacarificación del RSI lavado de paja de trigo, en las concentraciones de sustrato ensayadas, principalmente en las primeras 24h del proceso. A tiempos más largos, las diferencias originadas en las concentraciones de etanol obtenidas al añadir xilanasas se igualan.

La principal razón que explica estos resultados radica en que las xilanasas disponen en su estructura de un dominio de unión a carbohidratos (CBM, Carbohydrate Binding Domain). Estos CBM incrementan la concentración de enzima en la superficie del sustrato, pero también pueden unirse de modo inespecífico a la lignina (Palonen, 2004). Se ha observado, que la adsorción de las enzimas en sitios inespecíficos de la paja de trigo pretratada hidrotérmicamente incrementa a medida que aumenta la severidad de las condiciones de pretratamiento, debido a un aumento en el área superficial disponible (Nidetzky y *col.*, 1992). En este sentido, Zilliox y Debeire (1998), en un estudio cinético sobre la adsorción de xilanasas sobre paja de trigo pretratada hidrotérmicamente, observaron que las uniones inespecíficas de la xilanasas sobre la lignina se produjeron más rápidamente que la hidrólisis del xilano contenido en el material pretratado, siendo éstas irreversibles. García-Aparicio (2007) en un estudio sobre la hidrólisis enzimática, con y sin la adición de xilanasas, de paja de cebada pretratada mediante explosión por vapor, obtuvo una mejor eficacia de sacarificación en el sustrato pretratado en las condiciones más severas, 210 °C y 10 min. Esta autora observó que a pesar del bajo contenido

en xilano del RSI ( $<3\%$ ), se obtenían las máximas diferencias respecto a la mezcla control cuando se añadieron xilanasas al medio de hidrólisis, principalmente en las primeras 24 h del proceso, apoyando la idea de que las xilanasas podrían unirse a la lignina, disminuyendo las uniones inespecíficas de la celulasa.

Otro de los aspectos que se derivan del uso de xilanasas, es que su implementación en el proceso de SFS permite reducir la cantidad de celulasas utilizada a tiempos cortos, como así reflejan los datos experimentales obtenidos a las 24 h de fermentación. Como se observa en la Figuras 84 y 85, independientemente de la carga de sustrato utilizada, a las 24 h del proceso la concentración de etanol en el ensayo correspondiente a la adición de xilanasas y a una carga de celulasas de 10 UPF se iguala con el correspondiente a la no adición de xilanasas y una carga de celulasas de 20 UPF. No obstante, a partir de las 24 horas y a medida que se desarrolla el proceso, la carga de celulosa de 20 UPF siempre resulta en un incremento de la concentración de etanol respecto a la alcanzada con 10 UPF con adición de xilanasas.

Existen pocas referencias bibliográficas acerca del uso de xilanasas en el proceso de SFS. Mes Hartree y *col.* (1983) emplearon el sistema celulolítico de *Trichoderma* E58, que dispone de elevados niveles de enzimas xilanasas, y la levadura *S. cerevisiae*, en un proceso de SFS al 5% (p/v) de paja de cebada y de trigo pretratadas mediante explosión por vapor. Estos autores obtuvieron alrededor de 4,7 g/l de etanol tras 72 horas de ensayo en ambos sustratos, lo que se corresponde con un rendimiento de proceso en torno al 29% respecto al máximo teórico. A pesar de que aplicaron una etapa previa de sacarificación a 50 °C durante 24 horas, y que la dosis de enzima fue de 15 UPF/g de sustrato, los rendimientos en etanol fueron bastante menores que los obtenidos en este trabajo para la paja de trigo. En un estudio más reciente realizado por Öhgren y *col.* (2007) en ensayos de SFS del residuo de maíz pretratado mediante explosión por vapor y diluido hasta alcanzar una concentración de sólidos en el RSI del 8% (p/v), las cantidades de etanol liberadas a las 120 horas fueron de 20,6 g/l con la mezcla enzimática estándar, y 21,4 g/l cuando se incorporaba xilanasas. Estas concentraciones equivalen a un rendimiento de proceso del 78,2 y 81,5% del teórico, respectivamente (asumiendo un rendimiento teórico de fermentación del 0,46 g etanol/g de glucosa).

Por otro lado, en base a los resultados experimentales obtenidos, cabe destacar que las diferencias observadas en las concentraciones de etanol entre las 24 y las 48 horas resultaron significativas en todas las condiciones de SFS, produciéndose incrementos entre un 10-20%. El mayor cambio se observa en el pretratamiento en una etapa, Figura 84, donde en la concentración de sustrato del 12%, adición de xilanasas y con una carga de 20 UPF de celulasas, se obtuvieron 19,53 g/l de etanol a las 24 h, frente a los 24,5 g/l de etanol a las 48 h. En el resto de las experiencias se observan incrementos de entre 1,5 a 2,7 g/l, entre las 24 y 48 h del proceso.



Como se ha detallado, los resultados en base al potencial de producción de etanol de los RSI obtenidos tras el pretratamiento en una y en dos etapas son muy similares. Sin embargo, en el pretratamiento en dos etapas, habría que considerar también el potencial de etanol a partir de la corriente de pentosas generada en la primera etapa del proceso. Este se ha estimado en base a un cálculo teórico utilizando un rendimiento de conversión de xilosa a etanol de 0,44 g etanol/g xilosa (Agbogbo y *col.*, 2006). Teniendo en cuenta que la máxima concentración de xilosa obtenida en la FL A tras la primera etapa de pretratamiento (184 °C y 24 min) fue de 15 g/l, y realizando un balance respecto a la cantidad de materia prima introducida en el reactor, se puede determinar que a partir de esta corriente se obtendrían 71 g más de etanol por kg de paja de trigo.

En este sentido, cabe destacar el gran parecido en la composición de la fracción líquida obtenida por Nigam (2001) y el obtenido en este trabajo de investigación. En ambos la concentración de xilosa se encontró alrededor de 15 g/l. Este autor realizó un estudio de la fermentabilidad del hidrolizado generado tras un pretratamiento ácido de la paja de trigo (90 °C, 1.85% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 18 h), usando una cepa de *Pichia stipitis*. Tras un tratamiento de ebullición y neutralización con Ca(OH)<sub>2</sub> del hidrolizado, los rendimientos de fermentación alcanzaron valores de 0,41±0,01 g etanol/g xilosa, que equivale a una eficiencia de conversión del 80% del teórico.



## **5. CONCLUSIONES**



Con base en los distintos estudios realizados a lo largo del trabajo de investigación aquí presentado, se puede inferir que:

- I. El pretratamiento con agua caliente en fase líquida resulta un proceso adecuado para el tratamiento de la paja de trigo para su posterior conversión a etanol mediante hidrólisis enzimática y fermentación.
- II. En el pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo en el intervalo de temperatura de 170 a 200 °C y tiempo de residencia en el reactor de 0 a 40 min, ni la variación de la carga de sustrato de 5 a 10% (p/v), ni la aplicación o no de una sobrepresión añadida al reactor (30 bares) tuvieron un efecto significativo sobre el resultado del pretratamiento.
- III. El pretratamiento con agua caliente en fase líquida en una etapa de la paja de trigo, en las condiciones de 188 °C y 40 min, genera un residuo pretratado completo en el que se recupera prácticamente la totalidad de la glucosa (94 %) y alrededor de un 45 % de los azúcares procedentes de la fracción hemicelulósica de la materia prima.
- IV. El pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo en una etapa a 214 °C y 2,7 min, da como resultado la obtención de un residuo sólido insoluble en el que la digestibilidad enzimática de la celulosa alcanza un valor óptimo de 91,2% del teórico, lo que significa que alrededor del 87 % de la glucosa contenida en la materia prima estaría disponible para ser fermentada a etanol. No obstante, este hecho da lugar a una elevada pérdida de azúcares hemicelulósicos, de los cuales sólo se recuperan un 12 % de su contenido en la materia prima.
- V. Las condiciones óptimas en el pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo en dos etapas, son 184 °C y 24 min para la primera etapa, y 219 °C y 6 min, para la segunda etapa. En este esquema de trabajo, se obtiene en la primera etapa una fracción líquida enriquecida en azúcares hemicelulósicos, recuperándose un 71% de su contenido en la materia prima, y en la segunda etapa un residuo sólido insoluble enriquecido en celulosa, que además presentó una alta digestibilidad al ataque enzimático (86 % del teórico). Bajo esta configuración de pretratamiento, un 85 % de la glucosa contenida en la materia prima podría ser fermentada a etanol, y un 81 % de los azúcares hemicelulósicos estarían disponibles uniendo las distintas fracciones líquidas obtenidas a lo largo del proceso.

- VI. Atendiendo al potencial de producción de etanol del residuo pretratado completo a 188 °C y 40 min, con base en los rendimientos del proceso de SFS obtenidos sobre este material, se puede inferir que mediante esta configuración se obtienen 9 g de etanol por cada 100 g de paja de trigo, lo que significa que habría que utilizar 8,8 kg de paja de trigo para obtener 1 l de etanol. Si además se considera el potencial de producción de etanol a partir de los azúcares hemicelulósicos contenidos en la fase líquida de este residuo pretratado, se obtendrían 2 g más de etanol por cada 100 g de paja de trigo, lo que significa que habría que utilizar 7 kg de paja de trigo para obtener 1 l de etanol.
- VII. A partir del RSI obtenido en el pretratamiento en una etapa (214 °C y 2,7 min) y mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS), se obtienen 13 g etanol por cada 100 g de paja de trigo. En esta configuración de proceso habría que procesar 6 kg de paja de trigo para obtener un litro de etanol.
- VIII. A partir del RSI obtenido en la segunda etapa del doble pretratamiento (1ª etapa: 184 °C y 24 min. 2ª etapa: 219 °C y 6 min) y mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea, se obtienen 13 g etanol por cada 100 g de paja de trigo. Si además se considera el potencial de producción de etanol a partir de los azúcares contenidos en la fracción líquida generada en la primera etapa, se obtendrían 7,4 g etanol por cada 100 g de paja de trigo. Esto significa que haciendo utilización de las dos fracciones, habría que procesar 3,9 kg de paja de trigo para obtener 1 l de etanol.
- IX. La sacarificación y fermentación simultáneas del residuo sólido insoluble obtenido del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo requiere concentraciones de sustrato del 12 % (p/v), carga de celulasas de 20 UPF/g celulosa y adición de xilanasa [5% (v/p)], para obtener concentraciones de etanol en el medio de SFS de alrededor de 26 g/l.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**





- Agbogbo F.K., Coward-Kelly G., Torry-Smith M., y Wenger K.S. (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry* **41**, 2333-2336.
- Aguilar R., Ramirez J.A., Garrote G., y Vazquez M. (2002) Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* **55**, 309-318.
- Albersheim P. (1975) The walls of growing plant cells. *Scientific American* **232**, 80-95.
- Alcida D. (2006) Autohydrolysis of the agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Thesis Dissertation. University of Rovira y Virgili*. 189 pp.
- Allen S.G., Schulman D., Lichwa J., y Antal M.J. (2001) A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial Engineering and Chemistry Research* **40**, 2934-2941.
- Angenent L.T. (2007) Energy biotechnology: beyond the general lignocellulose-to-ethanol pathway. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 191-192.
- Aristidou A. y Penttilä M. (2000) Metabolic engineering application to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 187-198.
- Azzam A.M. (1989) Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **24**, 421-433.
- Ballesteros I., Negro M., Oliva J.M., Cabañas A., Manzanares P., y Ballesteros M. (2006) Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **130**, 496-508.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Carrasco J., Cabañas A., Navarro A.A., y Ballesteros M. (1998) Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **70-72**, 369-381.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Sáez F., y Ballesteros M. (2001) Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **91-93**, 237-252.
- Ballesteros M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I., Sáez F., y Oliva J.M. (2007) Fractionation of *Cynara cardunculus* (cardoon) Biomass by Dilute-Acid Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136-140**.
- Ballesteros M., Oliva J.M., Manzanares P., Negro M.J., y Ballesteros I. (2002) Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 559-561.
- Ballesteros M., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., y Ballesteros I. (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* **39**, 1843-1848.
- Bamaga O., Thakur M., y Verma M. (2003) Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* **34 (2)**, 53-58.
- Beery K., Hendrickson R., Brewer M., Mosier N., Dien B., Dreschel R., Welch G., Bothast R., y Ladisch M. (2000) Incremental ethanol yields from processing corn fiber by thermal

pretreatment and enzymatic hydrolysis. *BTEC Paper 46, 219th National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, CA., Biotechnology Secretariat (BTEC), Biobased Processing to Chemicals V: Process Engineering.*

Bidlack J., Malone M., y Benson R. (1992) Molecular Structure and components integration of secondary cell walls in plants. *Proc.Okla.Acad.Sci.* **75**, 51-56.

Bobleter O., Binder H., Concin R., y Burtscher E. (1981) Conversion of biomass to fuel raw material by hydrothermal treatment. *Commission of the European Communities, (Report) EUR* 554-562.

Bollok M., Reczey K., y Zacchi G. (2000) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **84-86**, 69-80.

Bothast R.J., Nichols N.N., y Dien B.S. (1999) Fermentation with new recombinat organism. *Biotechnology Progress* **15**, 867-875.

Bouchard J., Nguyen T.S., Chornet E., y Overend R.P. (1990) Analytical Methodology for Biomass Pretreatment Part 1: solid residues. *Biomass* **23**, 213-261.

Box G., Hunter W., y Hunter J. (1978) Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. *John Wiley & Sons Inc, New york*, 653 pp.

Brett C.T. y Waldron K.W. (1996a) Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. *En: Physiology and biochemistry of plant cell walls.Blackk, M and Charlwood, B.(Eds), Chapman & Hall, 2° edition, London* 44-74.

Brett C.T. y Waldron K.W. (1996b) The molecular component of the cell wall. *En: Physiology and biochemistry of plant cell walls.Blackk, M and Charlwood, B.(Eds), Chapman & Hall, 2° edition, London* 4-44.

Cadoche L. y López G.D. (1989) Análisis comparativo de pretratamientos lignocelulósicos para la obtención de etanol. *Ing.Química* 199-207.

Cara C., Moya M., Ballesteros I., Negro M.J., Gonzalez A., y Ruiz E. (2007) Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry* **42**, 1003-1009.

Cardona C.A. y Sánchez O.J. (2007) Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* **98**, 2415-2457.

Carpita N.C. y Gibeaut D.M. (1993) Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls During Growth. *Plant Journal* **3**, 1-30.

Carrasco F. (1991) Fundamentals of the Production of Furfural. *Afinidad* **48**, 183-189.

Carrillo F., Lis M.J., Colom X., López-mesa M., y Vallperas J. (2005) Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw : kinetic study. *Process Biochemistry* **40**, 3360-3364.

Chandra R.P., Bura R., Mabee W.E., Berlin A., Pan X., y Saddler J.N. (2007) Substrate pretreatment : the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **108**, 67-93.

- Chang V.S. y Holtzapple M. (2000) Fundamentals factors affecting biomass reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**, 5-37.
- Chang V.S., Nagwani M., y Holtzapple M.T. (1998) Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**, 135-159.
- Chang V.S., Nagwani M., Kim C.H., y Holtzapple M.T. (2001) Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass: Poplar wood and newspaper. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **94**, 1-28.
- Chernoglazov V.M., Ermolova O., y Klyosov A. (1988) Adsorption of high-purity endo-1,4-b-glucanases from trichoderma reesei on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan. *Enzyme and Microbial Technology* **10**, 503-507.
- Christakopoulos P., Koullas D.P., Kekos D., Koukios E.G., y Macris B.J. (1991) Direct ethanol conversion of pretreated straw by Fusarium oxysporum. *Bioresource Technology* **35**, 297-300.
- Chu B.C.H. y Lee H. (2007) Genetic improvement of Saccharomyces cerevisiae for xylose fermentation. *Biotechnology Advances* **25**, 425-441.
- Comisión Europea (1997) Energía para el Futuro: Fuentes de Energía Renovables. *Libro blanco para una estrategia y un plan de acción comunitarios*. Bruselas COM 599 final.
- Comisión Europea (2001) Libro Verde. *Libro Verde: Hacia una estrategia europea de seguridad del abastecimiento energético*. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Luxemburgo.
- Cornu A., Besle J.M., Mosoni P., y Grenet E. (1994) Lignin-Carbohydrate Complexes in Forages - Structure and Consequences in the Ruminal Degradation of Cell-Wall Carbohydrates. *Reproduction Nutrition Development* **34**, 385-398.
- Cosgrove D.J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 391-417.
- Crestini C. y Argyropoulos D.S. (1997) Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative P-31 and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and alpha-O-4 substructures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1212-1219.
- Cyran M., Courtin C.M., y Delcour J.A. (2003) Structural features of arabinoxylans extracted with water at different temperatures from two rye flours of diverse breadmaking quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4404-4416.
- Dahlman O., Jacobs A., y berg J. (2003) Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* **10**, 325-334.
- Dale B.E., Weaver J., y Byers F.M. (1999) Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77-79**, 35-45.
- Del Castillo E., Montgomery D.C., y McCarville D.R. (1996) Modified desirability functions for multiple response optimization. *Journal of Quality Technology* **28**, 337-345.
- Dien B.S., Jung H.-J.G., Vogel K.P., Casler M.D., Lamb J.F.S., Iten L., Mitchell R.B., y Sarath G. (2006) Chemical composition and response to diluted-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*.

Directiva 2003/30/CE (2003) Parlamento Europeo y del Consejo de 8 de mayo del 2003 relativa al fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables. *Diario Oficial de la unión europea* **2003**.

DOE (1993) Assessment of costs and benefits of flexible and alternative fuel use in the US transportation sector. *Technical report 11:Evaluation of wood to ethanol process*.(1993), DOE/EP-0004, US Department of Energy, Washington, DC.

DOE (2006) U.S. Department of Energy. *Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol.A Joint Research Agenda.A research roadmap resulting from the biomass to biofuels workshop* DOE/SC-0095.

Durot N., Gaudard F., y Kurek B. (2003) The unmasking of lignin structures in wheat straw by alkali. *Phytochemistry* **63**, 617-623.

Edmundo H., Janette de la Cerda A., y Marco López R. (2006) Straw Availability in the Wheat Stubbles of Three Provinces of Chile. *Agric.Téc* **66(4)**, 393-401.

Eggeman T. y Elander R.T. (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology* **96**, 2019-2025.

Emmel A., Mathias A., Wypych F., y Ramos L.P. (2003) Fractionation of Eucalyptus grandis chips by diluted acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology* **86**, 105-115.

Esteghlalian A., Hashimoto A.G., Fenske J.J., y Penner M.H. (1997) Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology* **59**, 129-136.

EurObserv'ER (2007) EurObserv'ER. Le Baromètre des Biocarburants. *Le Journal des Énergies Renouvelables*. **179**.

European Commision (2007) The impact of a minimum 10% obligation for biofuel use in the EU27 in 2020 on agriculture markets. *Brussels: European Commision, Directorate-General for Agriculture and Rural Development, 30 April 2007*.

Evers A.D., Blakeney A.B., y O'Brien L. (1999) Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 629-650.

FAOSTAT (2007) Food and Agricultural Organization (FAO). Available at <http://apps.fao.org/>.

Faunds C.B., Mandalari G., LoCurto R., Bisignano G., y Waldron K.W. (2004) Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 644-650.

Fengel D. y Wegener G. (1989) WOOD, Chemistry, Ultrastructure and Reactions. *Berlin-New York: Walter de Gruyter*. 612 pp.

García-Aparicio M., Ballesteros I., González A., Oliva J., Ballesteros M., y Negro M.J. (2006) Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**, 278-288.

García-Aparicio M.P. (2007) Sacarificación enzimática de paja de cebada pretratada mediante explosión por vapor para la obtención de etanol-combustible. *Tesis Doctoral.Universidad de Alcalá.Deparatamento de Microbiología*.

- Garrote G., Domínguez H., y Pajaró J.C. (2002) Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on basis of the severity factor. *Process Biochemistry* **37**, 1067-1073.
- Garrote G., Domínguez H., y Parajó J.C. (2001) Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochemistry* **36**, 571-578.
- Grohmann K., Torget R., y Himmel M. (1985) Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnology Bioengineering Symposium* **15**, 59-80.
- Hack C.J. y Marchant R. (1998) Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *maxianus*: development of an ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**, 323-327.
- Hagstrom C. y Sjöström E. (1982) Effect of oxygen pretreatment on alkaline pulping. *Pulping Conference, Proceedings of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry* 297-302.
- Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., Spencer-Martins I., y Gorwa-Grauslund M. (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 937-953.
- Hamelinck C.N., Van Hooijdonk G., y Faaij A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass & Bioenergy* **28**, 384-410.
- Hatakka A.I. (1983) Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**, 350-357.
- Hatfield R.D., Ralph J., y Grabber J.H. (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 403-407.
- Hayn M., Steiner W., Klinger R., Steinmüller H., Sinner M., y Esterbauer H. (1993) Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. in *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*, ed.by Saddler JN. CAB International, Wallingford, pp33-72.
- Helm R.F. y Ralph J. (1992) Lignin-Hydroxycinnamyl Model Compounds Related to Forage Cell-Wall Structure .1. Ether-Linked Structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2167-2175.
- Helm R.F. y Ralph J. (1993) Lignin Hydroxycinnamyl Model Compounds Related to Forage Cell-Wall Structure .2. Ester-Linked Structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 570-576.
- Himmel M.E., Adney W.S., Baker J.O., Elander R., McMillan J.D., Nieves R.A., Sheehan J.J., Thomas S.R., Vinzant T.B., y Zhang M. (1997) Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective. *ACS Symposium Series* **666**.
- Holtzapple M.T., Ripley E.P., y Nikolaou M. (1994) Saccharification, fermentation, and protein recovery from low-temperature AFEX-treated coastal bermudagrass. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 1122-1131.
- Howard R.L., Abotsi E., Rensburg J., y Howard S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2**, 602-619.

Iiyama K. y Lam T.B.T. (2001) Structural characteristics of cell walls of forage grasses - Their nutritional evaluation for ruminants - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **14**, 862-879.

Iiyama K., Lam T.B.T., y Stone B.A. (1990) Phenolic-Acid Bridges Between Polysaccharides and Lignin in Wheat Internodes. *Phytochemistry* **29**, 733-737.

Iiyama K., Lam T.B.T., y Stone B.A. (1994) Covalent Cross-Links in the Cell-Wall. *Plant Physiology* **104**, 315-320.

IogenCo.(2007)IogenCorporation.

[http://www.iogen.ca/cellulose\\_ethanol/what\\_is\\_ethanol/process.html](http://www.iogen.ca/cellulose_ethanol/what_is_ethanol/process.html).

Iyer P.V., Wu Z.W., Kim S.B., y Lee Y.Y. (1996) Ammonia recycled percolation process for pretreatment of herbaceous biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **57-58**, 121-132.

Jacquet G., Pollet B., y Lapierre C. (1995) New Ether-Linked Ferulic Acid-Coniferyl Alcohol Dimers Identified in Grass Straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2746-2751.

Jeffries T.W. y Jin C.K. (2004) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeast. *App.Microbiol.Biotechnol.* **63**, 495-509.

Juhász T., Szeengyel Z., Réczey K., Siika-aho M., y Viikari L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* **40**, 3519-3525.

Kabel M.A., Bos G., Zevalking J., Voragen A.G.J., y Schols H.A. (2007) Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology* **98**, 2034-2042.

Kim J.S., Lee Y.Y., y Park S.C. (2000) Pretreatment of wastepaper and pulp mill sludge by aqueous ammonia and hydrogen peroxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **84-86**, 129-139.

Kim S. y Dale B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass & Bioenergy* **26**, 361-375.

Kim S. y Holtzapple M.T. (2005a) Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technology*.

Kim S. y Holtzapple M.T. (2005b) Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* **96**, 1994-2006.

Kim T.H., Kim J.S., Lee Y.Y., y Sunwoo C. (2003) Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology* **90**, 39-47.

Kim T.H. y Lee Y.Y. (2005) Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **124**, 1119-1131.

Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., y Thomsen A.B. (2002) Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* **82**, 15-26.

- Klinke H.B., Olsson L., Thomsen A.B., y Ahring B.K. (2003) Potential Inhibitors From wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology and Bioengineering* **81**, 738-747.
- Klinke H.B., Thomsen A.B., Schmidt A.S., Olsson L., y Ahring B.K. (2001) Wet oxidation of wheat straw: potential fermentation inhibitors for ethanol production. *Biomass for energy and industry: 1 World Conference and Technology exhibition*. **2**, 1610-1613.
- Klinke H.B., Thomsen A.B., y Ahring B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 10-26.
- Koullas D.P., Christakopoulos P., Kekos D., y Macris B.J. (1992) Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnology and Bioengineering* **39**, 113-116.
- Krafft O. y Schaefer M. (1992) D-Optimal designs for a multivariate regression model. *Journal of Multivariate Analysis* **42**, 130-140.
- Lai Y.Z. (1981) Kinetics of Base-Catalyzed cleavage of glycosidic linkages. In: *The ekman Days.Int Symp.Wood Pulp.Chem.Stockholm*. **2**, 26-33.
- Lam T.B.T., Iiyama K., y Stone B.A. (1994) An Approach to the Estimation of Ferulic Acid Bridges in Unfractionated Cell-Walls of Wheat Internodes. *Phytochemistry* **37**, 327-333.
- Lam T.B.T., Iiyama K., y Stone B.A. (2003) Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochemistry* **64**, 603-607.
- Lam T.B.T., Kadoya K., y Iiyama K. (2001) Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry* **57**, 987-992.
- Larsson S., Quintana S., Reimann A., Nilvebrant N.O., y Olsson L.J. (2000) Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **84-86**, 617-632.
- Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., y Lynd L.R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for conversion to ethanol. *Bioresource Technology* **81**, 33-44.
- Laureano-Perez L., Teymouri F., Alizadeh H., y Dale B.E. (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**, 1081-1099.
- Lawther J.M., Sun R.C., y Banks W.B. (1996) Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **60**, 1827-1837.
- Lee K.M. y Gilmore D.F. (2006) Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **135**, 101-115.
- Lesoing G., Klopfenstein T., Rush I., y Ward J. (1980) Chemical Treatment of Wheat Straw. *Journal of Animal Science* **51**, 263-269.

- Li J., Henriksson G., y Gellerstedt G. (2005) Carbohydrate reactions during high-temperature steam treatment of aspen wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **125**, 175-188.
- Li J., Henriksson G., y Gellerstedt G. (2007) Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology* **98**, 3061-3068.
- Lin Y. y Tanaka S. (2007) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 627-642.
- Linde M., Gakbe M., y Zacchi G. (2007) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loading and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1100-1107.
- Liu C. y Wyman C.E. (2003) The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **42**, 5409-5416.
- Liu C. y Wyman C.E. (2005) Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology* **96**, 1978-1985.
- Liu R., Yu H., y Huang Y. (2005) Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* **12**, 25-34.
- Ludlow D., Schulz K., y Erjavec J. (1995) Teaching statistical experiment design using a laboratory experiment. *Journal of Engineering Education* **84**, 351-359.
- Lynd L.R. (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review Energy Environment* **21**, 403-465.
- Lynd L.R., Van Zyl W.H., McBride J.E., y Laser M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 577-583.
- Maloney M.T., Chapman T.W., y Baker A.J. (1985) Dilute Acid-Hydrolysis of Paper Birch - Kinetics Studies of Xylan and Acetyl-Group Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **27**, 355-361.
- Martín C. y Jönsson L.J. (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 286-285.
- Martín C., González Y., Fernández T., y Thomsen A.B. (2006) Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**, 1669-1677.
- McWilliams R.C. y Van Walsum G.P. (2002) Comparison of aspen wood hydrolysates produced by pretreatment with liquid hot water and carbonic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **98-100**, 109-121.
- Medve J., Karlsson J., Lee D, y Tjerneld F. (1998) Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose by Cellobiohydrolase I and Endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, Sugar production Pattern, and Synergism of the Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* **59**, nº 5, 621-634.



- Mes Hartree M., Hogan C., Hayes R.D., y Saddler J.N. (1983) Enzymatic hydrolysis of agricultural residues by *Trichoderma* cellulases and the fermentation of the liberated sugars to ethanol. *Biotechnology Letters* **5**, 101-106.
- Misrha P. y Prasad R. (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acid composition of *Saccharomices cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 294-298.
- Mitani T., Shinohara N., y Hashimoto K. (2006) A fundamental study of a microwave pretreatment system for wood biomass conversion. *Sustainable Humanosphere* **13**.
- MMA (2005) Análisis del Ciclo de Vida de Combustibles alternativos para el Transporte. Fase I. Análisis de Ciclo de Vida comparativo del etanol de cereales y de la gasolina. Energía y cambio climático. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, 2005.
- Mohagheghi A., Tucker M., Grohmann K., y Wyman C. (1992) High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **33**, 67-82.
- Mok W.S.L. y Antal J.A. (1992) Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. *Industrial Engineering and Chemistry Research* **31**, 1157-1161.
- Moniruzzaman M. (1996) Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **59**, 283-297.
- Montgomery D.C. (2004) Design and analysis of Experiments. 5th ed. New York: John Wiley & Sons 681 pp.
- Mosier N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzapple M., y Ladisch C.M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**, 673-686.
- Mosier N.S., Hall P., Ladisch C.M., y LADISCH M.R. (1999) Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **65**, 23-40.
- Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J.M., Cabañas A., y Ballesteros M. (2003a) Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**, 87-100.
- Negro M.J., Manzanares P., Oliva J.M., Ballesteros I., y Ballesteros M. (2003b) Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy* **25**, 301-308.
- Nevell T.P. y Zeronian S.H. (1985) Cellulose Chemistry and its applications. *Book Whole*. 357 pp.
- Nidetzky B., Steiner W., Hayn M., y Esterbauer H. (1992) Enzymatic hydrolysis of wheat straw after steam pretreatment: experimental data and kinetic modelling. *Bioresource Technology* **44**, 25-32.
- Nigam J.N. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* **87**, 17-27.
- NREL (2007) [www.eeze.energy.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.eeze.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html). National Renewable energy Laboratory Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-001 to LAP-005. LAP-010 and LAP-017. NREL. Golden. CO.

- Nunes A.P. y Pourquié J. (1996) Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood. *Bioresource Technology* **57**, 107-110.
- Öhgren K. (2006) Fuel Ethanol Production from Corn Stover: Optimization of Steam Pretreatment and Improvement of Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Thesis Dissertation*.
- Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J., y Zacchi G. (2007) A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry* **42**, 834-839.
- Ohgren K., Galbe M., y Zacchi G. (2005) Optimization of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**, 1055-1067.
- Ohgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hagerdal B., y Zacchi G. (2006) Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* **126**, 488-498.
- Olanders B. y Steenari B.M. (1995) Characterization of ashes from wood and straw. *Biomass and Bioenergy* **8**, 105-115.
- Oliva J.M., González A., Ballesteros I., Negro M.J., Sáez F., y Ballesteros M. (2005) Fermentability studies on steam exploded wheat straw. *Proceedings of the 14 European Biomass Conference World Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection. ETA-Renewable Energies, Paris 2005* 1347-1351.
- Olsson L. y HahnHagerdal B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* **18**, 312-331.
- Olsson L., Soerensen H.R., Dam B.P., Christensen H., Krogh K.M., y Meyer A.S. (2006) Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **129-132**, 117-129.
- Onnerud H. y Gellerstedt G. (2003) Inhomogeneities in the chemical structure of spruce lignin. *Holzforschung* **57**, 165-170.
- Palmarola-Adrados B., Choteborská P., Galbe M., y Zacchi G. (2005) Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* **96**, 843-850.
- Palmqvist E. y Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology* **74**, 25-33.
- Palonen H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Thesis Dissertation*.
- Palonen H., Thomsen A.B., Tenkanen M., Schmidt A.S., y Viikari L. (2004) Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **117**, 1-17.
- Pan X., Xie D., Yu R.W., Lam D., y Saddler J.N. (2007) Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: Fractionation and process optimization. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **46**, 2609-2617.

- PER (2005) Plan de Energías Renovables 2005-2010. *Ministerio de Industria, Comercio y Turismo*.
- Perez J.A., González A., Oliva J.M., Ballesteros I., y Manzanares P. (2007) Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for Bioconversion to Fuel-Ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 929-938.
- Peter K., Vollhardt P., y Schore N.E. (1998) Organic Chemistry. *W H Freeman & Co (Sd); 3rd Pkg edition (July 1998).1203 pp.*
- Rabinovich M.L., Melnick M.S., y Bolobova A.V. (2002) The structure and Mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry* **67**, 1026-1050.
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Jr., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., y Tschaplinski T. (2006) The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* **311**, 484-489.
- Ramos L.P., Nazhad M.M., y Saddler J.N. (1993) Effect of enzymic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 821-831.
- Ranganathan S., Macdonald D.G., y Bakhshi N.N. (1985) Kinetic-Studies of Wheat Straw Hydrolysis Using Sulfuric-Acid. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **63**, 840-844.
- Rentizelas A., Tolis A., y Tatsiopoulos I. (2006) Effect of greenhouse gas emissions trading on investment decisions for biomass-to-energy production. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* **98**, 129-138.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., y Mohnen D. (2001) Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Rodríguez G., Rodríguez R., Jiménez A., Guillen R., y Fernández-Bolaños J. (2007) Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 136-142.
- Romero R., Ferrer A., Capilla C., Zunica L., Balasch S., Serra V., y Alcover R. (1995) Teaching statistics to engineers: An innovative pedagogical experience. *Journal of Statistics Education* **3**.
- Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., y Wu Y.V. (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* **40**, 3693-3700.
- San Martin R., Perez C., y Briones R. (1995) Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. *Bioresource Technology* **53**, 217-223.
- Schmidt A.S. y Thomsen A.B. (1998) Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technology* **64**, 139-151.
- Sedlack M. y Ho N.W. (2004) Production of Ethanol from Cellulosic Biomass Hydrolysates Using Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Cofermenting Glucose and Xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **114**, 403-416.
- Silva S.S., Matos Z.R., y Carvalho W. (2005) Effects of sulfuric acid loading and residence time on the composition of sugarcane bagasse hydrolysate and its use as a source of xylose for xylitol bioproduction. *Biotechnology Progress* **21**, 1449-1452.

Silverstein R.A., Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., Boyette M.D., y Osborne J. (2007) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology* **98**, 3000-3011.

Sjöström E. (1981) Wood Chemistry. Fundamentals and Applications. *Academic Press, New York, San Diego*, pp 547 **1981**.

Sjöström E. (1977) Behavior of wood polysaccharides during alkaline pulping processes. *TAPPI* **60**, 151-154.

Smit R., Ede R.M., y Suckling I.D. (1999) Quantification of condensed and uncondensed structures in lignin. *APPITA Annual General Conference* **2**, 773-780.

Söderström J., Pilcher L., Galbe M., y Zacchi G. (2002) Two-step steam pretreatment of softwood with SO<sub>2</sub> impregnation for ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98-100**, 5-21.

Sreenath H.K., Koegel R.G., Moldes A.B., Jeffries T.W., y Straub R.J. (1999) Enzymic saccharification of alfalfa fiber after liquid hot water pretreatment. *Process Biochemistry* **35**, 33-41.

Sun R., Lawther J.M., y Banks W.B. (1996) The fractional composition of polysaccharides and lignin in alkaline pre-treated and steam pressure treated wheat straw. *Cellulose Chemistry and Technology* **30**, 57-69.

Sun R., Lawther J.M., y Banks W.B. (1997) A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products* **6**, 1-8.

Sun R.C., Fang J.M., Rowlands P., y Bolton J. (1998) Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2804-2809.

Sun R.C., Sun X.F., Wang S.Q., Zhu W., y Wang X.Y. (2002) Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products* **15**, 179-188.

Sun R. y Tomkinson J. (2003) Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. *European Polymer Journal* **39**, 751-759.

Sun X.F., Sun R.C., Fowler P., y Baird M.S. (2005a) Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 860-870.

Sun X.F., Sun R.C., Tomkinson J., y Baird M.S. (2003) Isolation and characterization of lignins, hemicelluloses, and celluloses from wheat straw by alkaline peroxide treatment. *Cellulose Chemistry and Technology* **37**, 283-304.

Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Geng Z.C., Fowler P., y Baird M.S. (2005b) Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers* **60**, 15-26.

Sun Y. y Cheng J. (2002) Hydrolysis of materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **83**, 1-11.

- Szczodrak J. (1988) Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 771-776.
- Szczodrak J. (1989) Use of cellulases from a B-glucosidase-hyperproducing mutant of *trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering* **33**, 1112-1116.
- Tabka M.G., Herpoël-Gimbert I., Monod F., Asther M., y Sigoillot J.C. (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Tae H.K., Lee Y.Y., Sunwoo C., y Jun S.K. (2006) Pretreatment of corn stover by low-liquid ammonia recycle percolation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **133**, 41-57.
- Tassinari T.H., Macy C.F., y Spano L.A. (1982) Technology advances for continuous compression milling pretreatment of lignocellulosics for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **24**, 1495-1505.
- Tengborg C., Stenberg K., Galbe M., Zacchi G., Larsson S., Palmqvist E., y Hahn-Hägerdal B. (1998) Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70-72**, 3-15.
- Tengerdy R.P. y Szakacs G. (2003) Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **13**, 169-179.
- Thygesen A., Thomsen M.H., Christensen B.H., Thomsen A.B., y Jørgensen H. (2004) Hydrothermal treatment of wheat straw on pilot plant scale. *Proceedings of the 2nd World Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection. Rome, Italy. 2004* **2**, 1476-1480.
- Tomás-Pejó E., Oliva J.M., Ballesteros M., y Olsson L. (2008) Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering* **Accepted**.
- Torget R.W., Kadam K.L., Hsu T., Philippidis G.P., y Wyman C.E. (1998) Prehydrolysis of lignocellulose. *Midwest Research Institute. Appl. Num. 443693. Patent Num. 5705369* 1-25.
- Van Walsum G.P., Allen S.G., Spenser M.J., Laser M.S., Antal M.J., y Lynd L.R. (1996) Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**, 157-170.
- Van Walsum G.P. y Shi H. (2004) Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology* **93**, 217-226.
- Varga E., Schmidt A.S., Réczey K., y Thomsen A.B. (2003) Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **104**, 37-50.
- Verma M.L. (1983) The utilization of fibrous agricultural residues. *Pearce, G.R., ed. Australian Government Publishing Service, Canberra, A.C.T., pp 85-99*.
- Vidal P.F. y Molinier J. (1988) Ozonolysis of lignin -- Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* **16**, 1-17.

Walch E., Zemann A., Schinner F., Bonn G., y Bobleter O. (1992) Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. *Bioresource Technology* **39**, 173-177.

Weil J., Brewer M., Hendrickson R., Sarikaya A., y Ladish M. (1998) Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70-72**, 99-111.

Wilkins M., Suryawati L., y Maness N.O. (2007) Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Wyman C.E. (1996) Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. *Taylor & Francis, Washington*. 417 pp.

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch C.M., y Lee Y.Y. (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* **96**, 1959-1966.

Wyman C.E. (2007) What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology* **25**, 153-157.

Yang B. y Wyman C.E. (2006) BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering* **94**, 611-617.

Yoon H.H. (1998) Pretreatment of lignocellulosic biomass by autohydrolysis and aqueous ammonia percolation. *Korean Journal of Chemical Engineering* **15**, 631-636.

Yu H., Liu R., Shen D., Jiang Y., y Huang Y. (2005) Study on morphology and orientation of cellulose in the vascular bundle of wheat straw. *Polymer* **46**, 5689-5694.

Yu Z. y Zhang H. (2003) Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* **24**, 257-262.

Zacchi G. y Axelsson A. (1989) Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 223-233.

Zhai H. y Lai Y.Z. (1995) The characteristics of wheat straw lignin in situ. *Proc.Int.Symp.Wood Pulping Chem., 8th, Helsinki* **2**, 119-124.

Zhu S.D., Wu Y.X., Yu Z.N., Zhang X., Wang C.W., Yu F.Q., y Jin S.W. (2006) Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry* **41**, 869-873.

Zilliox C. y Debeire P. (1998) Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 58-63.

## **ANEXO I**

ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA LAS VARIABLES RESPUESTA  
ANALIZADAS EN LOS DISTINTOS DISEÑOS EMPLEADOS EN ESTA  
INVESTIGACIÓN

## DISEÑO 1. EFECTO DE LAS VARIABLES DE PROCESO EN EL PAQL DE LA PAJA DE TRIGO

*Variable Respuesta: Xilano en RSI*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factor</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	1303,22734	10	130,322734	200,44185	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>A-Temp</b>	650,619316	1	650,619316	1000,67989	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>B-tiempo</b>	610,193696	1	610,193696	938,503588	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>C-Sobrepresión</b>	1,21585052	1	1,21585052	1,87002927	0.2297
<b>D-Carga de sustrato</b>	0,25238573	1	0,25238573	0,38817987	0.5606
<b>AB</b>	34,1262135	1	34,1262135	52,4875528	<b>0.0008</b>
<b>AC</b>	3,49186639	1	3,49186639	5,37063749	0.0683
<b>AD</b>	0,90004126	1	0,90004126	1,38430134	0.2923
<b>BC</b>	0,56169272	1	0,56169272	0,86390705	0.3953
<b>BD</b>	1,37775014	1	1,37775014	2,11903771	0.2052
<b>CD</b>	0,48852396	1	0,48852396	0,75137041	0.4257
<b>Residual</b>	3,25088632	5	0,65017726		
<b>Cor Total</b>	1306,47822	15			

*Variable Respuesta: Celulosa en RSI*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factor</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	632,133335	10	63,2133335	34,6688237	<b>0.0005</b>
<b>A-Temp</b>	223,015464	1	223,015464	122,310965	<b>0.0001</b>
<b>B-tiempo</b>	352,979845	1	352,979845	193,588842	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>C-Sobrepresión</b>	0,08428431	1	0,08428431	0,04622502	0.8383
<b>D-Carga de sustrato</b>	2,74407513	1	2,74407513	1,50496504	0.2745
<b>AB</b>	8,49717412	1	8,49717412	4,66020403	0.0833
<b>AC</b>	0,26482687	1	0,26482687	0,14524208	0.7188
<b>AD</b>	19,9171538	1	19,9171538	10,9233963	0.0814
<b>BC</b>	13,3889333	1	13,3889333	7,34304844	0.0723
<b>BD</b>	9,97310563	1	9,97310563	5,46966632	0.0665
<b>CD</b>	1,26847228	1	1,26847228	0,69568301	0.4423
<b>Residual</b>	9,11674045	5	1,82334809		
<b>Cor Total</b>	641,250075	15			



*Variable Respuesta: RAH en la fracción líquida*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factor</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	7555,625	10	755,5625	94,8901099	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>A-Temp</b>	0,0625	1	0,0625	0,00784929	0.9328
<b>B-tiempo</b>	60,0625	1	60,0625	7,54317111	0.0705
<b>C-Sobrepresión</b>	7,5625	1	7,5625	0,94976452	0.3745
<b>D-Carga de sustrato</b>	22,5625	1	22,5625	2,83359498	0.1531
<b>AB</b>	7439,0625	1	7439,0625	934,262166	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>AC</b>	0,0625	1	0,0625	0,00784929	0.9328
<b>AD</b>	5,0625	1	5,0625	0,63579278	0.4614
<b>BC</b>	18,0625	1	18,0625	2,26844584	0.1924
<b>BD</b>	0,0625	1	0,0625	0,00784929	0.9328
<b>CD</b>	3,0625	1	3,0625	0,38461538	0.5623
<b>Residual</b>	39,8125	5	7,9625		
<b>Cor Total</b>	7595,4375	15			

*Variable Respuesta: Eficacia de Sacarificación del RSI*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factor</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	10791,6057	10	1079,16057	60,2285373	<b>0.0001</b>
<b>A-Temp</b>	6331,39473	1	6331,39473	353,358577	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>B-tiempo</b>	4124,38716	1	4124,38716	230,184286	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>C-Sobrepresión</b>	13,3442394	1	13,3442394	0,74474925	0.4276
<b>D-Carga de sustrato</b>	45,9139268	1	45,9139268	2,56248118	0.1703
<b>AB</b>	36,4728513	1	36,4728513	2,03556963	0.2130
<b>AC</b>	118,650663	1	118,650663	6,6219579	0.0698
<b>AD</b>	43,4075734	1	43,4075734	2,42260023	0.1803
<b>BC</b>	22,3723161	1	22,3723161	1,24861111	0.3146
<b>BD</b>	54,4926925	1	54,4926925	3,04126675	0.1416
<b>CD</b>	1,16955497	1	1,16955497	0,0652735	0.8085
<b>Residual</b>	89,5888079	5	17,9177616		
<b>Cor Total</b>	10881,1945	15			

## DISEÑO 2. PRETRATAMIENTO EN UNA ETAPA

*Variable Respuesta: RAH en la fracción líquida*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factores</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	56,1633673	7	8,02333819	4982,27049	< 0.0001
<b>A-Temp (°C)</b>	12,5684697	1	12,5684697	7804,67108	< 0.0001
<b>B-tiempo (min)</b>	1,196045	1	1,196045	742,710771	0.0001
<b>AB</b>	8,02676784	1	8,02676784	4984,4002	< 0.0001
<b>A<sup>2</sup></b>	22,5130525	1	22,5130525	13979,9812	< 0.0001
<b>B<sup>2</sup></b>	0,06360644	1	0,06360644	39,4978365	0.0081
<b>A<sup>2</sup> B</b>	2,00417517	1	2,00417517	1244,53719	< 0.0001
<b>AB<sup>2</sup></b>	1,15542071	1	1,15542071	717,484216	0.0001
<b>A<sup>3</sup></b>	0	0			
<b>B<sup>3</sup></b>	0	0			
<b>Residuales</b>	0,00483113	3	0,00161038		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,00209006	1	0,00209006	1,52499143	<b>0.1423</b>
<b>Cor Total</b>	56,1681985	10			

<b>Adecuación del Modelo</b>			
<b>Desv. Estándar</b>	0,79	<b>R-Cuadrado</b>	0,94
<b>Media</b>	4,67	<b>Adj. R-Cuadrado</b>	0,88
<b>% C.V.</b>	17,01	<b>Pred. R-Cuadrado</b>	0,60
<b>PRESS</b>	33,53	<b>Predicción Adecuada</b>	11,24

*Variable Respuesta: Eficacia de Sacarificación del RSI*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factores</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	6378,9056	5	1275,78112	34,4649122	0.0007
<b>A-Temp (°C)</b>	3885,19707	1	3885,19707	104,95764	0.0002
<b>B-tiempo (min)</b>	115,281667	1	115,281667	3,11430578	0.1379
<b>AB</b>	659,719225	1	659,719225	17,8221521	0.0083
<b>A<sup>2</sup></b>	1471,2568	1	1471,2568	39,7456395	0.0015
<b>B<sup>2</sup></b>	24,3288028	1	24,3288028	0,6572366	0.4544
<b>Residual</b>	185,084052	5	37,0168104		
<b>Falta de Ajuste</b>	182,433986	3	60,8113285	45,8941877	<b>0.0714</b>
<b>Cor Total</b>	6563,98965	10			

<b>Adecuación del Modelo</b>			
<b>Desv. Estándar</b>	6,08	<b>R-Cuadrado</b>	0,97
<b>Media</b>	68,08	<b>Adj. R-Cuadrado</b>	0,94
<b>% C.V.</b>	8,94	<b>Pred. R-Cuadrado</b>	0,80
<b>PRESS</b>	1317,83	<b>Predicción Adecuada</b>	17,04

### DISEÑO 3. PRIMERA ETAPA DEL PRETRATAMIENTO EN DOS ETAPAS

*Variable Respuesta: RAH en la fracción líquida*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factores</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	3941,8828	5	788,37656	121,301815	< 0.0001
<b>A-Temp (°C)</b>	159,485147	1	159,485147	24,5388292	0.0043
<b>B-tiempo (min)</b>	176,655102	1	176,655102	27,1806463	0.0034
<b>AB</b>	1649,91489	1	1649,91489	253,860503	< 0.0001
<b>A<sup>2</sup></b>	1280,26594	1	1280,26594	196,985285	< 0.0001
<b>B<sup>2</sup></b>	1250,73336	1	1250,73336	192,441321	< 0.0001
<b>Residual</b>	32,4964867	5	6,49929733		
<b>Falta de Ajuste</b>	31,461387	3	10,487129	20,2630323	<b>0.1274</b>
<b>Cor Total</b>	3974,37929	10			

<b>Adecuación del Modelo</b>			
<b>Desv. Estándar</b>	2.55	<b>R-Cuadrado</b>	0,99
<b>Media</b>	49.35	<b>Adj. R-Cuadrado</b>	0,98
<b>% C.V.</b>	5.17	<b>Pred. R-Cuadrado</b>	0,94
<b>PRESS</b>	226.05	<b>Predicción Adecuada</b>	31.55

## DISEÑO 4. SEGUNDA ETAPA DEL PRETRATAMIENTO EN DOS ETAPAS

*Variable Respuesta: Rendimiento de hidrólisis enzimática (RHE) del RSI*

<b>Análisis de la Varianza</b>					
<b>Factores</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-valor Prob &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	1253,08299	5	250,616598	31,5577384	0.0009
<b>A-temp (°C)</b>	97,558211	1	97,558211	12,2845675	0.0172
<b>B-tiempo (min)</b>	57,2246593	1	57,2246593	7,20575111	0.0436
<b>AB</b>	74,218225	1	74,218225	9,34558744	0.0282
<b>A<sup>2</sup></b>	1012,095	1	1012,095	127,443392	< 0.0001
<b>B<sup>2</sup></b>	36,5761412	1	36,5761412	4,60568177	0.0847
<b>Residual</b>	39,7076297	5	7,94152593		
<b>Falta de Ajuste</b>	37,3278297	3	12,4426099	10,4568534	<b>0.0885</b>
<b>Cor Total</b>	1292,79062	10			

<b>Adecuación del Modelo</b>			
<b>Desv. Estándar</b>	2.82	<b>R-Cuadrado</b>	0,96
<b>Media</b>	72.65	<b>Adj. R-Cuadrado</b>	0,94
<b>% C.V.</b>	3.88	<b>Pred. R-Cuadrado</b>	0,80
<b>PRESS</b>	270.80	<b>Predicción Adecuada</b>	25.23



## **ANEXO II**

### **MÉTODOS ANALÍTICOS DE BIOMASA UTILIZADOS**

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE LABORATORIO DEL NREL (National  
Renewable Eneregies Laboratory, EEUU)

## **LAP (Laboratory Analysis Procedure)-001. MÉTODO ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN LA BIOMASA**

El contenido en sólidos totales de una muestra de biomasa es la cantidad de sólidos que permanecen después de eliminar toda la materia volátil mediante el calentamiento de la muestra a 150 °C hasta peso constante. El contenido en humedad de la muestra es la medida de la cantidad de agua (y otros componentes volatilizados a 105 °C) presentes en la muestra. Los resultados de los análisis químicos de las muestras de biomasa normalmente se expresan sobre la base de peso seco a 105 °C.

### **Procedimiento**

1. Secar los platillos de aluminio a 105 °C y pesarlos. Apuntar el peso.
2. Mezclar bien la muestra y pesar en el platillo entre 1 y 5 g ( $\pm 0,1$  mg) de muestra. Apuntar el peso. Se necesita como mínimo un triplicado.
3. Poner un blanco. Un platillo sin muestra y seguir todos los pasos. La diferencia en peso debe ser menor a un 0,5% de error.
4. Poner la muestra en el horno a 105 °C  $\pm 3$  °C y secar hasta peso constante. Normalmente una noche es suficiente.
5. Sacar la muestra del horno y enfriarla en un desecador a temperatura ambiente.
6. Pesar el platillo que contiene la muestra y anotar el peso.

### **Cálculos**

% Sólidos totales =  $[\text{Peso de la muestra seca más el plato} - \text{peso del plato} / \text{Peso de muestra antes del secado}] \times 100$

% Humedad  $[1 - \text{sólidos totales}] \times 100$



**LAP-002. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN LA BIOMASA MEDIANTE HPLC****Procedimiento**

1. Pesar  $0,3 \pm 0,01$  g de la muestra libre de extractivos y poner en un tubo de ensayo. Hacerlo por triplicado. Ésta será el  $P_1$ .
2. Añadir  $3,00 \pm 0,01$  ml ( $4,92 \pm 0,01$  g) de  $H_2SO_4$  al 72%, y agitarlo con una varilla durante 1 min hasta que esté completamente impregnado.
3. Poner el tubo en un baño a  $30 \pm 1$  °C y mantenerlo 2 horas.
4. Agitar la muestra cada 15 min para asegurar una mezcla completa
5. Pesar  $0,3 \pm 0,01$  g de glucosa de alta pureza (secada a 45 °C) y ponerlo en un tubo de ensayo. Añadir ácido y proceder como se ha descrito anteriormente. Esta muestra (estándar de recuperación de azúcares) será el patrón y se hará en paralelo con el resto de las muestras. Los resultados de recuperación de azúcares de esta muestra se utilizarán para corregir las pérdidas por degradación de azúcares durante la hidrólisis. Hacerlo por triplicado.
6. Una vez transcurridas las 2 horas de hidrólisis transferir los hidrolizados a una botella y diluir a 4% la concentración de ácido añadiendo  $84,00 \pm 0,04$  ml de agua desionizada. Tener cuidado de transferir todo el residuo sólido con el líquido de hidrólisis. El peso total añadido a la botella tarada es 89,22 g (0,3 de muestra, 4,92 g de  $H_2SO_4$  al 72%, y 84,00 g de agua desionizada). Puesto que la densidad de la solución de 4% de ácido es 1,0250g/ml, el volumen total de la solución ( $V_f$ ) es 87,0 ml.
7. Cerrar cada una de las botellas e introducirlas en el autoclave.
8. Meter en autoclave las muestras en las botellas cerradas durante 1 h. a  $121$  °C $\pm 3$  °C.
9. Después de que acaba el autoclave dejar enfriar las botellas 20 min a temperatura ambiente antes de abrirlas.
10. Filtrar a vacío la solución de hidrólisis a través de uno de los crisoles de filtración previamente metidos en la mufla y pesados (hasta una precisión de 0,1 mg).  

NOTA: Una alícuota de este hidrolizado se usa para la determinación de lignina ácido soluble y grupos O-acilo en paralelo con la determinación de carbohidratos (LAP-004 y LA-017 )
11. Pasar una alícuota del hidrolizado a través de una columna de pre-cromatografía compuesta de carbonato cálcico y resina de intercambio iónico
12. Filtrar el líquido neutralizado utilizando una jeringa con un filtro de 0,5  $\mu$ m. Analizar mediante HPLC.

### Cálculos

1. Crear una curva de calibración mediante análisis correlación lineal para cada azúcar a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la concentración en mg/ml de los azúcares presentes en cada solución analizada por HPLC.
2. Calcular la cantidad de azúcar recuperado de cada estándar de recuperación de azúcares (ver punto 5 del procedimiento) a lo largo de las dos etapas de hidrólisis. Este valor será una estimación de la cantidad de cada azúcar individual destruido durante el procedimiento de hidrólisis:

$$\% R = [C_2 / C_1] \times 100\%$$

donde:

% R = % de recuperación del estándar de recuperación de azúcares.

$C_1$  = concentración conocida del estándar de recuperación de azúcares antes de la hidrólisis, en mg/ml.

$C_2$  = concentración del estándar de recuperación de azúcares detectada por HPLC después de la hidrólisis, en mg/ml.

Corregir los valores de concentración de azúcares (en mg/ml ) obtenidos por HPLC para cada azúcar, determinados en la muestra hidrolizada:

$$C_{\text{corr.}} = C_{\text{HPLC}} / [\% R / 100]$$

donde :

$C_{\text{corr}}$  = concentración de azúcar corregida en la muestra hidrolizada.

$C_{\text{HPLC}}$  = concentración de azúcar por HPLC

% R determinado en el punto 2.

Si la biomasa ha sido preparada según el método descrito en LAP-010 para extractivos, primero calcular el porcentaje de cada azúcar presente en base al peso seco a 105 °C libre de extractivos, y a continuación corregir este valor en base al peso seco de la muestra inicial a 105 °C.

- Calcular el porcentaje de cada azúcar en base libre de extractivos:

$$\% \text{ azúcar (libre de extractivos)} = \frac{C_{\text{corr}} \times \frac{1}{1000 \text{ g}} \times Vf}{P_1 \times \% \text{ Sólidos Totales}} \times 100$$

donde :

P<sub>1</sub> = peso de la muestra en gramos

V<sub>f</sub> = Volumen de filtrado, 87,0 ml

C<sub>corr.</sub> = concentración de azúcar corregida en la muestra hidrolizada

- Corregir el % de azúcares en base libre de extractivos, calculado antes, a una base de peso seco inicial (sin extracción) a 105 °C:

$$\% \text{ de azúcar en muestra inicial} = \% \text{ azúcar (libre de extractivos)} \times \frac{100 - \% \text{ de extractivos}}{100}$$

### LAP-003. DETERMINACIÓN DE LIGNINA ÁCIDO INSOLUBLE

Para la determinación de la lignina ácido insoluble se utiliza un método que continuaría a partir del punto 10 del LAP-002.

#### Procedimiento

1. Una vez filtrado y recogido todo el hidrolizado y tomadas las alícuotas para la determinación de carbohidratos y lignina soluble en ácido, continuar la filtración utilizando agua desionizada para arrastrar cualquier partícula pegada a la botella y para lavar el residuo filtrado exento de ácido, mediante filtración a vacío.
2. Secar el crisol de filtración y su contenido a  $105 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, o hasta peso constante.
3. Enfriar en desecador y anotar el peso,  $P_2$ , del crisol, lignina ácido insoluble, y cenizas ácido insolubles, con una precisión de 0,1 mg.
4. Poner el crisol y su contenido en una mufla y calentar a  $575 \pm 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 3 horas, o hasta que se ha eliminado el carbono. Calentar lentamente ( $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), para evitar la aparición de llamas.
5. Secar en desecador y anotar el peso  $P_3$ , del crisol y las cenizas ácido insolubles, con precisión de 0,1 mg.

Nota: La cantidad de cenizas ácido insolubles que permanecen en el crisol no es igual al contenido de cenizas totales de la muestra (este sería otro procedimiento, n° 005)

#### Cálculos

- Para muestras liofilizadas, secadas al aire, secadas en estufa o que no requieran preparación, calcular el % de lignina ácido insoluble en base al peso seco a  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  de la muestra inicial de la forma siguiente:

$$\% \text{ de lignina insoluble} = \frac{P_2 - P_3}{P_1 \times \% \text{ sólidos totales}} \times 100$$

donde:

$P_1$  = peso inicial de muestra

$P_2$  = Peso de crisol, lignina ácido insoluble, y cenizas ácido insolubles.

$P_3$  = peso de crisol y cenizas ácido insolubles.

- Para una muestra extraída, puede ser necesario dar los resultados en base a peso seco a 105 °C, exento de extractivos, o en base a peso seco a 105 °C de la muestra original (sin extraer), o a ambos. Para el cálculo del % de residuo ácido insoluble (%RAI) en base al peso libre de extractivos:

$$\% \text{ de residuo ácido insoluble}_{\text{libre de extractivos}} = \frac{P_2 - P_3}{P_1 \times \% \text{ recuperación de sólidos}} \times 100$$

donde:

$P_1$  = peso inicial de muestra extraída

$P_2$  = Peso de crisol, residuo ácido insoluble, y cenizas ácido insolubles.

$P_3$  = peso de crisol y cenizas ácido insolubles

- Para corregir el residuo ácido insoluble calculado antes en base libre de extractivos, a una base de peso seco a 105 °C de la muestra original sin extraer:

$$\% \text{ residuo ácido insoluble}_{\text{muestra original sin extraer}} = \% \text{ RAI}_{\text{libre de extractivos}} \times \frac{100 - \% \text{ extractivos}}{100}$$

## LAP-004. DETERMINACIÓN DE LIGNINA ÁCIDO SOLUBLE

La lignina ácido soluble es la pequeña fracción de lignina que se solubiliza durante el procedimiento de hidrólisis para la obtención de la lignina ácido-insoluble. Se denomina ASL (del inglés, “acid soluble lignin”) y se puede cuantificar por espectroscopia ultravioleta. El procedimiento describe un método para determinar ASL, que utiliza el hidrolizado generado en el procedimiento LAP-002 (Determinación de carbohidratos en biomasa por HPLC).

### Procedimiento

1. Medir la absorbancia del hidrolizado a 205 nm, utilizando una solución de ácido sulfúrico al 4% (preparada diluyendo 3 ml de ácido sulfúrico al 72% p/p con 84 ml de agua desionizada) como blanco.
2. Si la lectura de absorbancia es mayor de 0,7, la muestra se debe diluir, de forma que la absorbancia medida esté entre 0,2 y 0,7. Diluir el blanco de ácido sulfúrico al 4% de la misma forma que la muestra.
3. Analizar las muestras por duplicado.

### Cálculos

1. Se utiliza un coeficiente de extinción de 110 l/g-cm, para calcular la cantidad lignina ácido soluble en el hidrolizado. Los coeficientes a 205 nm para la mayoría de las maderas están entre 88 y 113 l/g-cm. El valor de 110 utilizado aquí está de acuerdo con el valor utilizado en el procedimiento TAPPI, y representa una media de valores de diferentes maderas y pulpas.
2. Para una muestra de biomasa sólida, el % de ASL en base al peso seco a 105 °C, o en base libre de extractivos se calcula de la siguiente manera:

$$\% ASL = \frac{\frac{A}{b \times a} \times df \times V \times \frac{L}{1000 ml}}{\frac{P \times \% Sólidos Totales}{100}} \times 100$$

donde :

A = Absorbancia a 205 nm

df = factor de dilución

b = longitud de paso de luz de la cubeta del espectrofotómetro, 1 cm.

a = coeficiente de extinción = 110 l/g-cm.

V = volumen de filtrado. Este volumen será 87 ml.

P = peso de muestra inicial en gramos (de LAP-002).

% sólidos totales = % de contenido en sólidos totales de la muestra (inicial, o después de la extracción), en base a peso seco a 105 °C, determinado en el análisis LAP-002.

3. Para una muestra de biomasa extraída, el % de ASL, calculado anteriormente, se puede convertir en base al peso seco de la muestra inicial a 105 °C:

$$\% \text{ ASL muestra inicial} = \% \text{ ASL(libre de extractivos)} \times \frac{100 - \% \text{ de extractivos}}{100}$$

donde:

% ASL(libre de extractivos) = % de lignina soluble en ácido, o en base al peso seco a 105 °C libre de extractivos, según se determinó en la etapa anterior.

% de extractivos = % de extractivos en la muestra extraída determinado en LAP-010.

## **LAP-005. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN BIOMASA**

Este método abarca la determinación de cenizas, expresada como el porcentaje de residuo que permanece después de una oxidación seca (oxidación a 550-600 °C), de maderas duras y blandas, materiales herbáceos, etc. Todos los resultados se dan relativos al peso de la muestra secada en estufa a 105 °C. Las muestras se deben haber secado a 105 °C según el LAP 001, antes del ensayo de cenizas. También se puede utilizar material secado al aire, pero en este caso se debe corregir su contenido en humedad antes de calcular el contenido en cenizas. Las muestras de ensayo deben pesar de 0,5 a 1,0 g y su tamaño debe ser menor de 1 mm de diámetro.

### **Procedimiento**

1. Determinar la tara del crisol, introduciendo el crisol vacío en la mufla a  $575 \pm 25$  °C hasta peso constante. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Si se utiliza un crisol de porcelana es recomendable calentar el crisol durante al menos tres horas, enfriar, pesar y volver a calentar durante otra hora más, o hasta que el peso de la tara varíe menos de 0,3 mg.
2. Pesar de 0,5 a 1,0 g y anotar el peso descontando la tara del crisol ( $P_1$ ). Introducir el crisol en la mufla a  $575 \pm 25$  °C durante un mínimo de tres horas, o hasta que el carbono se haya eliminado. Calentar lentamente y evitar sobrepasar la temperatura.. Si la muestra tiende a encenderse, cubrir parcialmente el crisol.
3. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Repetir el proceso de calentamiento hasta que el peso sea constante (variación menor de 0,3 mg). Anotar como  $P_2$ .

### **Cálculos**

1. Para muestra secadas a 105 °C:

$$\% \text{ cenizas} = (P_1/P_2) \times 100$$

2. Para muestras secadas al aire:

$$\% \text{ de cenizas} = [P_1/(P_2 \times T/100)] \times 100$$

Donde : T = % de sólidos de la muestra, en base al peso seco a 105 °C (LAP-001).



**LAP-010. DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS EN BIOMASA**

Para muchos tipos de materiales biomásicos es necesario separar los extractivos antes de la caracterización del material, con el fin de evitar interferencias que pudieran falsear los resultados. En este método se utiliza una extracción Soxhlet con agua (para extraer taninos, azúcares, etc.), y posteriormente con etanol al 95% (para extraer ceras, grasas, resinas, etc.).

**Procedimiento**

1. La muestra se debe componer de aproximadamente 10 g de muestra molida. Si la muestra requiere molienda antes de la extracción, pasar la muestra a través de una malla de 40 mesh. Si la muestra es una muestra húmeda, secar al aire antes de moler.
2. Secar el dedal de extracción del Soxhlet a 105 °C hasta peso constante. Secar a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.
3. Añadir cuidadosamente la muestra al dedal, procurando no llenar el dedal hasta el borde (dejar aproximadamente 1 cm). Poner un tapón de lana de vidrio para evitar pérdidas de la muestra durante la extracción.
4. Pesar el matraz o recipiente de recogida de muestra, con una precisión de 0,1 mg.
5. Montar el aparato Soxhlet utilizando al menos 160 ml de agua desionizada. Insertar el dedal y calentar a reflujo durante 24 horas. Periódicamente chequear la velocidad de reflujo y ajustar la velocidad de calentamiento para se produzcan de 4 a 5 cambios de disolvente por hora.
6. Una vez completado el tiempo de extracción, retirar el dedal y transferir la muestra con cuidado a un embudo Buchner. Retirar el disolvente residual mediante filtración a vacío y lavar la muestra con agua, recogiendo todo el filtrado. Dejar secar al aire la biomasa en el embudo Buchner mientras todavía está unido al sistema de vacío.
7. Combinar el filtrado con el disolvente en un matraz de 250 ml y poner en el rotavapor para retirar el disolvente. Utilizar un baño con agua a 45 °C para calentar el matraz durante la evaporación.
8. Después de que todo el disolvente se ha eliminado, colocar el matraz en una estufa a 40 °C durante 24 horas. Después, dejar enfriar el matraz a temperatura ambiente en un desecador. Pesar el matraz con una precisión de 0,1 mg.
9. Para la extracción y el cálculo de los extractivos en etanol, el procedimiento es el mismo a partir del punto 5, pero sustituyendo el agua desionizada por etanol al 95%.

**Cálculos**

1. Calcular el peso seco de la muestra, utilizando el dato del contenido en sólidos medio según el método LAP-001:

$$\text{Peso seco (PS)} = \frac{(\text{Peso dedal y muestra} - \text{peso dedal}) \times \% \text{ de sólidos totales}}{100}$$

$$\% \text{ de extractivos (etanol)} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times 100$$

$$\% \text{ de extractivos (agua)} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times 100$$

$$\% \text{ de extractivos Total} = \% \text{ extractivos (etanol)} + \% \text{ extractivos (agua)}$$

## **LAP-017. DETERMINACIÓN DE GRUPOS O-ACILO EN BIOMASA MEDIANTE HPLC**

Los grupos alifáticos presentes en maderas y materiales herbáceos son grupos acetilo y formilo que se pueden combinar como grupos O-acilo con la parte polisacáridica. Este método emplea una hidrólisis ácida diluida para separar los grupos O-acilo de los polisacáridos. A continuación se cuantifican los ácidos acético y fórmico mediante HPLC. El protocolo de este método utiliza el hidrolizado generado en el método LAP-002, en el punto 10. Se debe tener especial cuidado en las etapas posteriores al autoclave en el LAP-002, para asegurar que no se pierden componentes volátiles. Todos los resultados se expresan relativos al peso seco a 105 °C de la muestra; si son materiales donde se ha hecho una extracción, los resultados se pueden dar también en base al peso libre de extractivos.

### **Procedimiento**

1. Una vez sacadas las muestras hidrolizadas del autoclave (como parte del procedimiento LAP-002), dejar enfriar los contenidos de las botellas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Agitar vigorosamente el contenido de las botellas y dejar enfriar más, hasta que el contenido esté a temperatura ambiente y los sólidos depositados en el fondo.
2. Abrir las botellas y con una jeringa desechable, tomar inmediatamente 1,5 ml de muestra, teniendo cuidado nuevamente de no remover los sólidos depositados en el fondo. Filtrar esta muestra rápidamente a través de un filtro de 0,2 µm en un vial y cerrar inmediatamente.
3. Prepara una serie de estándares de calibración con agua desionizada para hacer una curva de calibración de cada compuesto de interés. Un esquema sugerido para una columna HPX-87H es preparar una serie de estándares multi-componentes que contengan ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, en el intervalo de 0,02 a 0,5 mg/ml.
4. Preparar un estándar de verificación de la calibración (CVS) independiente, utilizando productos químicos de diferente procedencia que los utilizados en los estándares de calibración. Este estándar debe contener cantidades precisas de cada componente contenido en los estándares de calibración, en una concentración intermedia del rango validado de la curva de calibración. Se debe medir después de cada curva de calibración y a intervalos regulares en la secuencia de HPLC. Este estándar se utiliza para verificar la calidad de la curva de calibración a lo largo del experimento de HPLC.

5. Analizar las muestras utilizando una columna HPX-87H de BioRad y las siguientes condiciones instrumentales:

Eluyente: ácido sulfúrico 0,01 N filtrado por un filtro de 0,2 µm

Velocidad de flujo: 0,6 ml/min

Tª de la columna: 55 °C

Detector: Índice de refracción

Tiempo de ensayo: 20 minutos.

Nota: Tener en cuenta que puede haber pequeñas cantidades de furfural e hidroximetilfurfural y estos picos pueden interferir en los cromatogramas.

### **Cálculos**

1. Crear una curva de calibración mediante análisis de regresión lineal para cada componente a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la concentración en mg/ml de los ácidos orgánicos presentes en cada solución analizada por HPLC.
2. Para muestras liofilizadas, secadas al aire, o muestras secadas en estufa, o para muestras que no requieren preparación, calcular el porcentaje de cada ácido orgánico presente en la muestra en base al peso inicial a 105 °C:

$$\% \text{ analito} = \frac{C \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times V_f}{P_i \times \% \text{ sólidos totales}} \times 100$$

C = concentración del componente en la muestra hidrolizada en mg/ml.

**Nota:** Si la muestra se ha preparado según LAP-010, primero calcular el % de analito en base libre de extractivos, y luego corregir a en base a P. seco a 105 °C de la muestra inicial.